



Purification et caractérisation d'un super-complexe respiratoire

Lucie Bergdoll

► To cite this version:

Lucie Bergdoll. Purification et caractérisation d'un super-complexe respiratoire. Biodiversité. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066310 . tel-01127233

HAL Id: tel-01127233

<https://theses.hal.science/tel-01127233>

Submitted on 7 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité Biologie

Programme doctoral : Interface pour le vivant

**PURIFICATION ET CARACTÉRISATION
D'UN SUPER-COMPLEXE RESPIRATOIRE**

Présentée par
Lucie BERGDOLL

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université Pierre et Marie Curie

Soutenance prévue le 12 septembre 2014, devant le jury composé de

M. Thierry FOULON	Professeur	Examineur
	Université Pierre et Marie Curie	
Mme. Cécile BREYTON	Chargée de recherche	Rapporteure
	Institut de Biologie Structurale	
M. Axel MAGALON	Directeur de recherche	Rapporteur
	Institut de Microbiologie de la Méditerranée	
M. Martin PICARD	Chargé de recherche	Examineur
	Université Paris Descartes	
M. William RUTHERFORD	Professeur	Examineur
	Imperial College	
M. Daniel PICOT	Directeur de recherche	Directeur de thèse
	Institut de Biologie Physico-chimique	

Sommaire

Sommaire	5
Liste des Figures	7
Liste des tableaux	10
I Introduction	13
I.1 Processus de transformation d'énergie	13
I.1.1 Différents mécanismes	13
I.1.2 Quelques données sur l'évolution de ces processus	16
I.1.3 Les transferts d'électrons	17
I.1.4 La théorie chimiosmotique	19
I.1.5 Les acteurs des chaînes respiratoires aérobies	21
I.1.6 Les chaînes respiratoires procaryotes	43
I.2 L'organisation en super-complexes	43
I.2.1 Deux théories contradictoires	44
I.2.2 Les super-complexes, pour quoi faire ?	46
I.3 Le super-complexe de la chaîne respiratoire de <i>G. stearothermophilus</i>	49
I.3.1 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> : une bactérie thermophile	49
I.3.2 Le super-complexe cytochrome b_6c : CcOx <i>caa</i> ₃	50
I.3.3 La chaîne respiratoire de <i>G. stearothermophilus</i>	51
I.4 Objectifs	56
II Matériel et Méthodes	60
II.1 Matériel	60
II.1.1 Souches bactériennes	60
II.1.2 Produits chimiques	60
II.1.3 Systèmes de purification et colonnes	61
II.1.4 Spectrophotomètres	61
II.2 Méthodes	62

II.2.1	Production et purification du super-complexe	62
II.2.2	Analyses biophysiques de l'échantillon	67
III	Résultats	76
III.1	Production du super-complexe	78
III.2	Purification	81
III.2.1	Solubilisation et test de détergents	81
III.2.2	<i>G. stearothermophilus</i> possède-t-il un super-complexe?	86
III.2.3	Mise en place d'un protocole de purification	90
III.2.4	Vers la cristallographie	108
III.3	Caractérisation du super-complexe purifié	109
III.3.1	Composition en sous-unités du super-complexe	109
III.3.2	Polydispersité de l'échantillon	112
III.3.3	Spectroscopie visible	116
III.3.4	Étude du super-complexe par spectroscopie RPE	118
III.3.5	Fixation du CO sur le super-complexe	130
III.4	Titration redox des cofacteurs	137
IV	Discussion	145
IV.1	Diversité des oxydases	145
IV.2	L'isolement d'un super-complexe respiratoire	146
IV.2.1	Le(s) super-complexe(s) de <i>G. stearothermophilus</i>	146
IV.2.2	Le(s) super-complexe(s) purifié(s)	147
IV.3	Caractérisation de l'hème c_i	153
IV.4	Les transferts d'électrons dans une chaîne respiratoire à ménaquinone . . .	155
IV.4.1	Un décalage des potentiels redox	156
IV.4.2	Le Q-cycle et les ménaquinones	158
IV.5	Perspectives	160
V	Bibliographie	163
	Liste des abréviations	176
A	Annexes	177
A.1	Obtention de cristaux	177
A.2	Gels natifs et gels 2D	178

Liste des Figures

I.1	Schéma général de l'organisation d'une chaîne respiratoire	21
I.2	Transport de protons et d'électrons par les quinones	22
I.3	Oxydation et réduction des quinones	23
I.4	Représentation schématique d'un arbre phylogénétique des quinones . . .	24
I.5	Localisation des trois familles de NADH déhydrogénase	26
I.6	Mécanisme hypothétique de transfert de protons et d'électrons au sein du complexe I	28
I.7	Structure de la quinone : fumarate réductase de <i>E. coli</i>	30
I.8	Arbre phylogénétique des sous-unités cytochrome <i>b</i> et cytochrome <i>b</i> ₆ -SU IV	31
I.9	L'hème <i>c</i> _i au sein du site Q _i	32
I.10	Structure et organisation des cofacteurs au sein du cytochrome <i>b</i> ₆ <i>f</i>	33
I.11	Schéma de l'état de spin	34
I.12	Représentation schématique d'un complexe Rieske/cytochrome <i>b</i>	36
I.13	Arbre phylogénétique des oxygènes réductases	38
I.14	Comparaison de structures de différentes O ₂ Rs	40
I.15	Organisation structurale d'une ATP synthase F ₀ F ₁ et cycle de fixation de l'ATP sur le rotor F ₁ de l'ATP synthase	42
I.16	Structures de super-complexes mitochondriaux résolus par microscopie électronique	45
I.17	Organisation moléculaire des cristae mitochondriaux	49
I.18	Schéma hypothétique du super-complexe de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	50
I.19	Schéma de la chaîne respiratoire de <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	51
I.20	Organisation génétique de l'opéron Rieske/cytochrome <i>b</i>	52
I.21	Prédiction de l'environnement du site Q _i de <i>G. stearothermophilus</i>	53
I.22	Structure et organisation des cofacteur de la CcOx <i>caa</i> ₃ de <i>T. thermophilus</i>	55
II.1	Représentation schématique du dispositif expérimental du spectrophoto- mètre "OPO"	62
II.2	Spectre visible d'hème <i>c</i>	68

II.3	La cellule électrochimique	69
II.4	Orientation des espèces paramagnétiques dans un champ magnétique . . .	71
III.1	Expression de la CcOx <i>caa</i> ₃ en fonction des conditions de culture	79
III.2	Schéma du processus de solubilisation d'une protéine membranaire	82
III.3	Solubilisation en FOS choline 14	84
III.4	Influence de la température sur la solubilisation des membranes	85
III.5	Centrifugation des membranes après solubilisation en β -DDM et C ₁₂ E ₈ .	85
III.6	Dissociation du super-complexe de <i>Bacillus subtilis</i> sur gradient de sac- charose	86
III.7	Ultracentrifugation sur gradient de saccharose de membranes solubilisées	87
III.8	Ultracentrifugation sur gradient de saccharose, test de détergents	87
III.9	Co-élution du cytochrome <i>b</i> ₆ <i>c</i> et de la CcOx <i>caa</i> ₃ sur colonne échangeuse d'anions	88
III.10	Co-élution du cytochrome <i>b</i> ₆ <i>c</i> et de la CcOx <i>caa</i> ₃ sur tamis moléculaire .	89
III.11	Chromatographie échangeuse d'anions du super-complexe dissocié	90
III.12	Introduction d'un gradient de saccharose	92
III.13	Chromatographie sur colonne Q ceramic	94
III.14	Élimination de l'excès de lipides et détergent	97
III.15	Purification du super-complexe en C ₁₂ E ₈	99
III.16	Purifications en β -DDM et FC ₁₄	101
III.17	Échange de détergent sur colonne échangeuse d'anions	103
III.18	Chromatogrammes d'élution du super-complexe sur différentes colonnes de tamis moléculaire	106
III.19	Le super-complexe en fin de purification	107
III.20	Gels SDS-PAGE du super-complexe purifié	111
III.21	Microscopie électronique du super-complexe	113
III.22	Réinjection de différents pics sur la colonne Tsk G4000sw	114
III.23	Estimation du poids moléculaire du super-complexe par gel filtration . . .	115
III.24	Migration sur gradient de saccharose d'un échantillon purifié	116
III.25	Spectres visibles de super-complexe	117
III.26	Spectre RPE du super-complexe purifié	119
III.27	Signal RPE de la protéine de Rieske	119
III.28	Signal RPE de la protéine de Rieske en présence de TDS	121
III.29	Quinones et analogues de quinones	121
III.30	Spectre RPE de l'hème <i>c</i> _i	122
III.31	Spectres de l'hème <i>c</i> _i de <i>C. reinhardtii</i> et de <i>H. mobilis</i>	123
III.32	L'hème <i>c</i> _i en NQNO	124

III.33	Effet du pH sur le signal RPE de l'hème c_i	126
III.34	Schéma hypothétique de l'organisation du site Q_i	127
III.35	Spectres de super-complexe en présence d'azide de sodium	128
III.36	Spectres RPE de membranes de <i>G. stearothermophilus</i>	129
III.37	Différences de spectres optiques en présence de CO	130
III.38	Spectres de photo-dissociation du CO	132
III.39	Spectres des changements d'absorption photo-induits en présence de CO sur cellules entières de <i>S. cerevisiae</i> et <i>G. stearothermophilus</i>	133
III.40	Spectres RPE de l'hème c_i en présence de CO	133
III.41	Comparaison des chaînes respiratoires de <i>B. subtilis</i> , <i>C. glutamicum</i> et <i>G.</i> <i>stearothermophilus</i>	134
III.42	Spectres des changements d'absorption photo-induits en présence de CO de cellules entières de différents organismes	135
III.43	Structures de différents types d'hèmes	136
III.44	Hèmes a et a_3 dans la structure de la CcOx caa_3 de <i>Thermus thermophilus</i> .136	
III.45	Déconvolution des différences de spectres, en utilisant les potentiels redox déterminés par titration	138
III.46	Titration par RPE	141
III.47	Suivi par spectroscopie optique d'une titration électrochimique	142
IV.1	Comparaison des potentiels redox de plusieurs complexes Rieske/ b	156
IV.2	Le mécanisme du Q-cycle	159
IV.3	Constante de stabilité de la semiquinone	160

Liste des tableaux

I.1	Composition en sous-unités du cytochrome b_6c	52
I.2	Composition en sous-unités de la CcOx caa_3 de <i>Geobacillus stearothermo-</i> <i>philus</i>	54
I.3	Composition en sous-unités de la CcOx bo_3	55
II.1	Colonnes utilisées pour la purification du super-complexe	61
II.2	Marqueurs de poids moléculaire utilisés pour calibrer la colonne TSK G4000sw.	66
II.3	Tampons de purification	66
II.4	Coefficients d'extinction molaire des hèmes	69
II.5	Médiateurs utilisés pour la titration électrochimique par spectroscopie visible	70
II.6	Médiateurs utilisés pour la titration chimique par spectroscopie RPE	74
III.1	Détergents utilisés pour l'étude du super-complexe	83
III.2	Utilisation d'une colonne plus résolutive	95
III.3	Diminution de la concentration en détergent de l'échantillon	104
III.4	Étude de la composition du super-complexe par spectrométrie de masse	110
III.5	Titrations électrochimiques du super-complexe	139
IV.1	Comparaison des hèmes a au sein de différents super-complexes	150
IV.2	Le super-complexe de <i>G. stearothermophilus</i>	151
IV.3	Comparaison de potentiels redox	157

I Introduction

I.1	Processus de transformation d'énergie	13
I.1.1	Différents mécanismes	13
I.1.2	Quelques données sur l'évolution de ces processus	16
I.1.3	Les transferts d'électrons	17
I.1.4	La théorie chimiosmotique	19
I.1.5	Les acteurs des chaînes respiratoires aérobies	21
I.1.6	Les chaînes respiratoires procaryotes	43
I.2	L'organisation en super-complexes	43
I.2.1	Deux théories contradictoires	44
I.2.2	Les super-complexes, pour quoi faire ?	46
I.3	Le super-complexe de la chaîne respiratoire de <i>G. stearo-thermophilus</i>	49
I.3.1	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> : une bactérie thermophile . . .	49
I.3.2	Le super-complexe cytochrome b_6c : CcOx <i>caa3</i>	50
I.3.3	La chaîne respiratoire de <i>G. stearothermophilus</i>	51
I.4	Objectifs	56

Les réactions chimiques nécessaires au fonctionnement des organismes tendent vers un équilibre thermodynamique. Lorsqu'un système atteint l'équilibre, aucune réaction n'a lieu, rendant la vie impossible. Les processus bioénergétiques permettent de maintenir les déséquilibres chimiques et redox, utilisables par les réactions métaboliques. La discipline de la bioénergétique se concentre sur la compréhension des mécanismes de transformation d'énergie par l'oxydo-réduction de substrats, l'absorption de la lumière et la formation de gradients d'ions à travers les membranes qui en résultent.

I.1 Processus de transformation d'énergie

I.1.1 Différents mécanismes

Les processus de conversion d'énergie ont été un élément essentiel de l'apparition de la vie, ainsi qu'un mécanisme fondamental pour son évolution. Les principaux mécanismes

de transformation d'énergie sont très conservés au sein des trois domaines du vivant.

L'énergie convertie par les cellules est distribuée majoritairement sous forme d'adénosine tri-phosphate (ATP). L'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique (P_i) possède un ΔG de -57 kJ/mol, dû au ratio $[ATP]/[ADP]$ maintenu loin de l'équilibre dans la cellule. En effet, le rapport d'action de masse $[ATP]/[ADP]$ à l'équilibre est de 0,0000001, contre 1000 dans le cytoplasme. L'ATP est générée par la phosphorylation de l'ADP par une molécule de P_i , et utilisée pour effectuer des réactions endergoniques, comme la synthèse de molécules, le passage de constituants à travers des membranes, la contraction musculaire, etc...

Il existe différents mécanismes de transformation d'énergie en ATP.

1. **La fermentation** comprend les mécanismes de transformation d'énergie qui ne mettent pas en jeu des potentiels chimiques transmembranaires, mais repose sur la phosphorylation au niveau des substrats ("substrate level phosphorylation", en anglais). Elle peut avoir lieu aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène. Comme exemples, on peut mentionner la production d'acide lactique ou d'éthanol à partir du glucose. La fermentation a un rendement en ATP par molécule de glucose bien inférieur aux processus respiratoires décrits ci-dessous.
2. **Les mécanismes qui mettent en jeu un potentiel électrochimique transmembranaire** généré par une différence de concentration d'ions, généralement H^+ (mais aussi parfois Na^+). Ils regroupent les processus décrits par la théorie chimiosmotique de Peter Mitchell (cf. I.1.4) qui va associer les transports de protons à un transfert d'électrons à travers la membrane. Le potentiel électrochimique de proton $\Delta\mu_{H^+}$ ainsi généré va pouvoir être utilisé, entre autre, pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Il est courant de diviser ces mécanismes en deux grands groupes qui distinguent la source d'énergie utilisée pour générer ce gradient, bien que ceux-là peuvent se retrouver agir de concert dans une même membrane :

La photosynthèse Dans les processus photosynthétiques, l'excitation lumineuse transmise principalement par des chlorophylles ou bactériochlorophylles, va se retrouver dans un centre réactionnel où généralement une paire de (bactério)-chlorophylles va être excitée pour céder un électron. Les chaînes photosynthétiques peuvent être divisées en deux grands groupes :

La photosynthèse anoxygénique. Dans ce cas, les électrons utilisés pour transférer les protons à travers la membrane par l'intermédiaire d'une quinone vont, une fois libérés, soit effectuer un cycle et être réutilisés pour reréduire la (bactério)-chlorophylle soit être transférés sur les ferredoxines

et revenir dans la chaîne par l'intermédiaire du complexe NADH déshydrogénase. La photosynthèse anoxygénique est principalement effectuée par des bactéries photosynthétiques anoxygéniques (comme les bactéries pourpres, les chlorobi ou les héliobactéries).

La photosynthèse oxygénique. Au contraire dans la photosynthèse oxygénique, deux centres réactionnels sont présents : le premier, dans le photosystème II, va utiliser l'eau pour réduire la chlorophylle oxydée par l'excitation lumineuse, libérant ainsi protons et oxygène moléculaire ; le deuxième, dans le photosystème I, va récupérer à la fin de la chaîne de transfert l'électron produit dans le photosystème II pour lui faire traverser la membrane et réduire une molécule de NADP en NADPH. Nous sommes ici en présence d'une réduction nette, appelée aussi phosphorylation réductrice. Les équivalents de réduction produits vont être utilisés dans la partie dite obscure de la photosynthèse qui comprend la fixation du CO_2 . La photosynthèse oxygénique est responsable de la production de l'oxygène atmosphérique terrestre, elle est présente chez les cyanobactéries et les chloroplastes des plantes.

La respiration utilise une chaîne de transfert d'électrons analogue à celle utilisée par la photosynthèse, mais l'énergie nécessaire pour la faire fonctionner ne provient pas de photons mais de deux couples redox, l'un injectant des électrons au début de la chaîne et l'autre les récupérant en bout de chaîne. Le premier groupe doit donc être réducteur et l'autre oxydant, la différence de potentiel entre les deux doit être suffisante pour générer un $\Delta\mu_{H^+}$ assez grand pour la synthèse d'ATP. Il est courant de diviser les chaînes respiratoires en deux grands groupes selon l'utilisation ou non du couple oxygène/eau comme accepteur terminal d'électrons :

Respiration anoxygénique utilise un autre couple redox que $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$. Différents oxydants peuvent être observés, par exemple, certaines bactéries du phylum *Pseudomonas* utilisent le couple $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ comme accepteur terminal d'électrons, alors que les bactéries du genre *Clostridium* utilisent le couple $\text{SO}_4^{2-}/\text{SO}_3^{2-}$.

Respiration oxygénique Les électrons transitent d'un donneur d'électron (réducteur), par exemple le couple NAD^+/NADH , jusqu'à l'accepteur final qui est l'oxygène du couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$. C'est la chaîne respiratoire la plus étudiée car elle est présente dans la plupart des mitochondries, ainsi que chez de nombreux procaryotes.

I.1.2 Quelques données sur l'évolution de ces processus

L'évolution des processus énergétiques suscite le débat depuis plusieurs décennies. En 1929, dans un article sur les origines de la vie, J. Haldane présente la fermentation comme le mécanisme primordial de transformation de l'énergie, et le décrit, tout comme Pasteur le fit auparavant, comme étant "la vie sans oxygène" (Haldane, 1929). Pendant longtemps l'idée que la fermentation était le processus ancestral, la première voie de transformation de l'énergie utilisée par les cellules, a été un pilier de l'hypothèse de la « primordial-soup » (soupe originelle). Cependant cette théorie sur l'origine de la vie a été depuis remise en question (Lane *et al.*, 2010), tout comme le "modèle de la fermentation".

Ce modèle repose principalement sur les données géochimiques montrant l'absence d'oxygène dans l'environnement primitif. Il apparaît cependant que les premiers processus chimiosmotiques ne reposaient pas sur l'oxygène mais utilisaient du CO_2 , présent à cette époque dans l'atmosphère. La fermentation est un processus complexe qui requiert de nombreuses enzymes. Les grandes divergences existantes entre les enzymes des archées et celles des bactéries suggèrent que la fermentation n'est pas le mode de production d'énergie le plus ancestral, et que ce processus a évolué indépendamment dans ces deux règnes (Ducluzeau *et al.*, 2013).

La découverte relativement récente de cheminées hydrothermales alcalines (Kelley *et al.*, 2001) a permis l'émergence de nouvelles théories sur l'origine de la vie et de la bioénergétique. Ces cheminées créent des gradients de protons, qui auraient pu être utilisés pour effectuer les premières synthèses de molécules organiques. La théorie chimiosmotique aurait donc joué un rôle primordial dans l'apparition de la vie sur terre. Il existe de nombreuses théories divergentes sur l'origine de la bioénergétique (pour une revue voir Ducluzeau *et al.* (2013)), notamment sur les voies métaboliques utilisées par LUCA (Last Common Universal Ancestor) pour transformer l'énergie. Des nombreuses données (Lane *et al.*, 2010) suggèrent que LUCA transformait l'énergie par couplage chimiosmotique, de ce fait, LUCA possédait une membrane différente de celles de archées et bactéries "modernes", à travers laquelle un gradient de proton était établi. Il semblerait que LUCA poussait sur un milieu contenant H_2/CO_2 , et utilisait le mécanisme chimiosmotique pour transformer l'énergie. Ce point de vue permet de comprendre pourquoi ce mécanisme et les enzymes qui mettent en place les gradients d'ions sont ubiquitaires et très conservées.

La respiration cellulaire basée sur la théorie chimiosmotique est apparue très probablement avant la photosynthèse, tout comme les processus de fermentation. Cependant, l'apparition de la photosynthèse a profondément influé sur l'évolution de la respiration

et de la fermentation. En effet, l'augmentation de l'oxygène atmosphérique a conféré un avantage sélectif aux organismes capables d'utiliser l'oxygène pour produire leur énergie et a ainsi favorisé la respiration aérobie. La fermentation de type "glycolyse" est apparue, permettant le catabolisme du glucose produit par la photosynthèse en acide lactique, éthanol ou CO_2 . La respiration cellulaire est beaucoup plus efficace en terme de production d'ATP que la glycolyse. A part quelques exceptions, toutes les cellules utilisent les réactions oxydatives comme principale source d'énergie.

I.1.3 Les transferts d'électrons

Les mécanismes qui mettent en jeu un potentiel électrochimique transmembranaire nécessitent une translocation de protons à travers la membrane. Cette réaction est endergonique et thermodynamiquement défavorable, et doit être associée à une réaction exergonique : les transport d'électrons d'une espèce réductrice vers une espèce oxydatrice. Les électrons transitent dans des complexes protéiques membranaires par l'intermédiaire de groupes redox, au sein de ce qu'on appelle une chaîne de transfert d'électrons (CTE). Les CTE sont composées de complexe protéiques, la plupart transmembranaires, qui peuvent varier selon le type de chaîne ou d'organisme (cf. I.1.5).

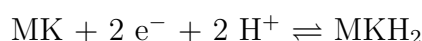
I.1.3.1 Les réactions d'oxydo-réduction

Les CTE fonctionnent grâce à des séquences de réactions d'oxydo-réduction dans lesquelles les électrons sont transférés d'un couple redox à l'autre. Le nombre d'électrons transférés dépend du couple redox.

Par exemple, le cytochrome *c* effectue une oxydo-réduction à 1 e^-



Alors que la ménaquinone effectue une réduction à 2 e^- couplée à une addition de 2 H^+



Le potentiel redox d'une espèce reflète la capacité de cette espèce à accepter ou à céder des électrons. Les électrons se déplacent vers les potentiels redox plus élevés.

La relation entre potentiel redox et ΔG La différence d'énergie libre de Gibbs ΔG disponible lors d'une réaction d'oxydo-réduction dépend de la différence de potentiel d'oxydo-réduction ΔE_h entre le couple donneur et accepteur. En général pour les couples redox A et B :

$$\Delta E_h = E_{h(A)} - E_{h(B)}$$

Il existe une relation directe entre la différence de potentiel redox de 2 couples ΔE_h , et la variation d'énergie libre de Gibbs ΔG accompagnant le transfert d'électron entre les 2 couples :

$$\Delta G = -nF\Delta E_h$$

Avec n le nombre d'électrons transférés et F la constante de Faraday. A partir de cette équation, on peut déduire un équilibre pour $\Delta E_h = 0$.

La stœchiométrie du transfert de proton dépend de l'énergie libre libérée par le transfert d'électrons, en tenant compte non pas des potentiels redox à l'équilibre E_m mais des potentiels redox effectifs qui prennent en compte les concentrations respectives des formes oxydes et réduites.

I.1.3.2 Transfert d'électrons

Les électrons passent d'un centre redox à l'autre par effet tunnel (prédiction de mécanique quantique) (Moser *et al.*, 1992).

Trois facteurs principaux influencent le transfert :

1. La distance "bord à bord" entre le donneur et l'accepteur d'électron est un facteur important.
2. La différence de potentiel redox entre les 2 espèces.
3. La réaction du donneur ou de l'accepteur d'électrons (et leur environnement) aux variations de charges qui découlent du transfert d'électron.

Des distances supérieures à 14 Å entre groupes redox entraînent des vitesses de transfert d'électrons trop lentes pour des réactions enzymatiques (Page *et al.*, 1999), par exemple une distance de 25 Å induit un temps de transfert supérieur à la seconde.

Il est intéressant de noter que pour les protéines possédant plusieurs groupes redox et dont la structure est connue, la distance entre deux groupes successifs est toujours inférieure à 14 Å dans la conformation sous laquelle se déroule le transfert (Page *et al.*, 1999). Les variations de distance liées à des changements conformationnels sont un moyen de contrôler le transfert des électrons, comme dans les complexes Rieske/cytochrome *b* où la protéine de Rieske est mobile.

Si la distance est le facteur dominant dans les réactions de transfert d'électrons, le potentiel redox reste un facteur majeur. Le potentiel redox d'une espèce reflète la capacité de cette espèce à accepter ou à céder des électrons. Les réactions qui sembleraient défavorables au niveau du potentiel redox ("uphill") peuvent être des points de contrôle.

I.1.3.3 Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)

L'accepteur final d'électrons des chaînes respiratoire aérobie est l'oxygène, qui réagit très facilement avec des électrons isolés, comme ceux des semiquinones, et est convertie en anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Cet ion peut être à l'origine d'une cascade de réactions redox non spécifiques, en générant des molécules hautement réactives comme l'eau oxygénée (H_2O_2) ou les radicaux hydroxyles ($HO\cdot$) et hydroperoxydes ($HOO\cdot$). Ces molécules sont regroupées dans la catégorie des dérivés réactifs de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species » ou ROS en anglais) et sont toxiques pour les cellules. Les ROS interviennent dans de nombreux processus cellulaires et peuvent entraîner des mutations du génome, des réactions d'oxydation non spécifiques, elles peuvent également intervenir dans le vieillissement cellulaire (Raffaello et Rizzuto, 2011).

Des enzymes comme la superoxyde dismutase (SOD), la catalase et la peroxydase, permettent de convertir les ROS en des molécules moins dangereuses pour les composés cellulaires, mais leur mécanisme d'action est relativement lent, ces enzymes ne peuvent donc faire face à des productions massives de ROS.

Les principaux centres de production de ROS habituellement proposés sont les NADH:quinones oxydoréductases (Galkin et Brandt, 2005) (dont fait partie le complexe I de la chaîne mitochondriale) et les complexes Rieske/cytochrome *b* au niveau de leur site Q_o (cf. I.1.5). Les ROS peuvent être produites suite à des court-circuits, des fuites, ou des réactions inverses, ce qui en plus de générer de la toxicité pour la cellule entraîne une perte d'efficacité catalytique (Rutherford *et al.*, 2012).

La cinétique de transfert des électrons est donc extrêmement importante, un électron qui ne sera pas transféré assez rapidement est susceptible de réagir avec l'oxygène. Le positionnement des cofacteurs et leurs potentiels redox sont déterminants pour éviter la production de ROS.

I.1.4 La théorie chimiosmotique

Lors de la découverte des complexes protéiques impliqués dans la respiration et la photosynthèse, le mécanisme utilisé pour la production de l'ATP était encore inconnu. On supposait ces protéines associées à la membrane, mais le rôle central de cette membrane dans la synthèse de l'ATP n'était pas encore à l'ordre du jour. En 1953, dans un article de *Nature* (Slater, 1953), Bill Slater développait la théorie de l'intermédiaire à haute énergie : le transfert d'électrons générerait un intermédiaire phosphorylé ($\sim P$) qui permet la synthèse d'ATP. En 1961, deux auteurs proposaient deux théories alternatives,

impliquant dans les deux cas les protons et la membrane.

- dans Williams (1961), R. Williams émettait l'hypothèse que le transport d'électron était couplé à l'injection de protons dans un milieu hydrophobe (par exemple la bicouche lipidique de la membrane). Le pH local étant très bas, il pourrait déplacer l'équilibre entre P_i , ADP et ATP en faveur de ce dernier.
- dans Mitchell (1961), P. Mitchell énonçait son hypothèse du "couplage de la phosphorylation au transfert d'électrons et de protons par un mécanisme de type chimiosmotique".

D'après la théorie chimiosmotique, la membrane bioénergétique (membrane plasmique des procaryotes, membrane interne mitochondriale ou membrane du thylakoïde pour le chloroplaste) joue un rôle fondamental pour la synthèse d'ATP. Dans ces membranes on trouve deux types de pompes à protons : les pompes à protons associées à un transfert d'électrons et les pompes à protons associées à la synthèse d'ATP. La base de la théorie de P. Mitchell est que la première pompe génère un déséquilibre de charges de part et d'autre de la membrane, dont le retour à l'équilibre est assuré par la seconde pompe, et permet la synthèse de l'ATP à partir d'ADP et de P_i . "L'intermédiaire de haute énergie" serait donc un gradient électrochimique de protons.

Il est possible de séparer le gradient électrochimique de proton $\Delta\mu_{H^+}$ en deux composantes :

- la différence de concentration en protons de part et d'autre de la membrane ΔpH
- la différence de potentiel électrique entre les 2 phases aqueuses séparées par la membrane, le potentiel membranaire $\Delta\psi$

$$\Delta\mu_{H^+} = -F\Delta\psi + 2.3RT\Delta pH$$

$\Delta\mu_{H^+}$ peut s'exprimer en kJ.mol^{-1} , cependant il est courant en bioénergétique d'utiliser $\Delta\mu_{H^+}$ en unités de potentiel électrique, c'est-à-dire en millivolt, et de s'y référer comme étant la force protomotrice, ou *pmf*, exprimée par le symbole Δp . Le composant majoritaire est souvent $\Delta\psi$ et le gradient de pH est autour de 0,5 unités (~ 30 mV).

La théorie chimiosmotique de Mitchell comprenant des pompes à proton électrogéniques et une ATP synthase translocatrice de protons est restée une hypothèse jusqu'à ce que des scientifiques travaillant sur la photosynthèse en aient démontré la validité. André Jagendorf fut le premier, en 1966, à valider cette hypothèse en utilisant des chloroplastes

cassés et en les soumettant à un saut de pH induisant ainsi la synthèse d'ATP (Jagendor A, 1966).

Dans certaines bactéries utilisant la fermentation, le gradient électrochimique de protons est remplacé par un gradient électrochimique de sodium (Na^+), comme chez *Propionigenium modestum*, qui convertit le succinate en propionate et CO_2 .

I.1.5 Les acteurs des chaînes respiratoires aérobies

Il existe une grande diversité de chaînes bioénergétiques de transfert d'électrons, fonctionnant avec différents donneurs et accepteurs. Cependant, on observe un nombre limité d'enzymes et de repliements, témoignant d'une conservation importante. En effet, on ne recense que 500 "core genes" responsables pour le transfert des électrons dans l'ensemble des règnes du vivant (Kim *et al.*, 2013). Des transporteurs d'électrons tels que les quinones ou les cytochromes *c* participent au transfert des électrons entre les différents complexes au sein de ces chaînes. Les complexes respiratoires les mieux caractérisés sont les complexes mitochondriaux, mais il existe une grande diversité au sein des déshydrogénases, des oxydases et des complexes Rieske/*b* notamment chez les procaryotes.

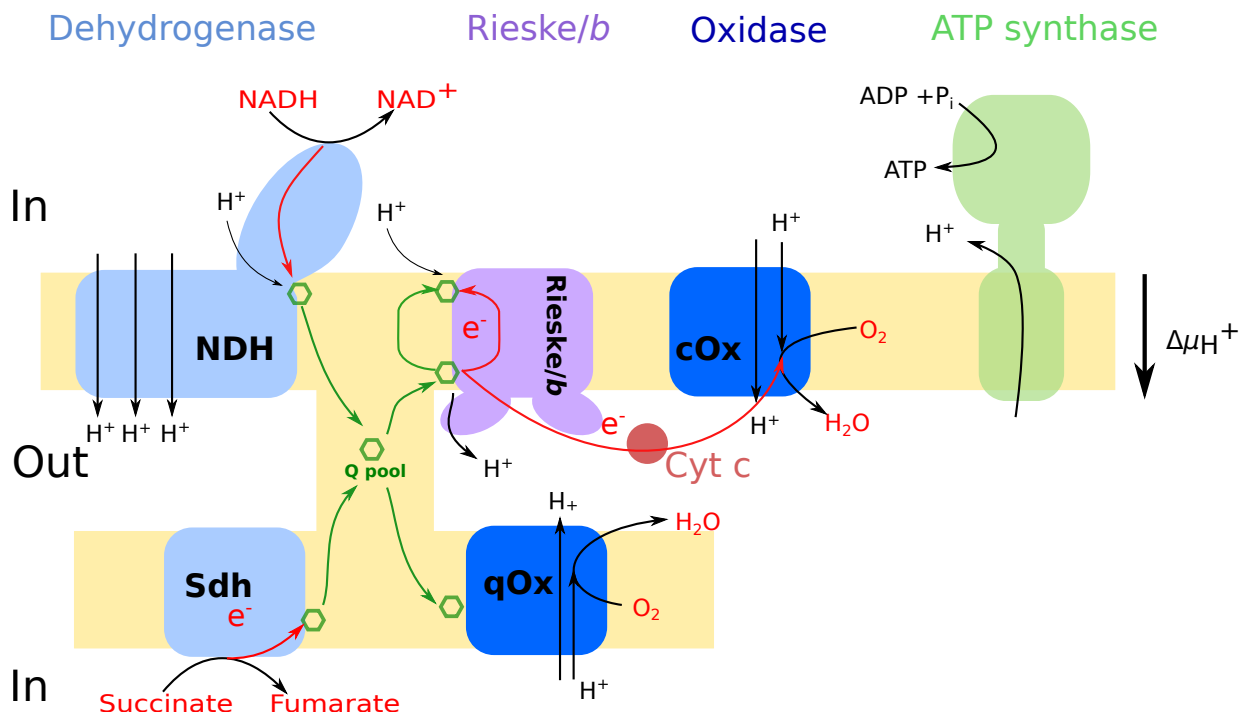


FIGURE I.1 – **Schéma général de l'organisation d'une chaîne respiratoire.** Les composés réduits issus du cycle de Krebs sont réoxydés au niveau des déshydrogénases, leurs électrons servant à réduire le pool de quinone. Ces quinones peuvent ensuite être réduites par les quinol oxydases (qOx), ou les complexes Rieske/*b*, qui céderont leurs électrons aux cytochromes *c* puis aux cytochromes *c* oxydases (cOx).

Dans un premier temps, les acteurs de la chaîne respiratoire seront présentés de manière "générale", puis au sein de la section sur *Geobacillus stearothermophilus* les complexes participant aux super-complexes seront analysés plus en détails.

Les Quinones

Les quinones sont de petites molécules hydrophobes participant à la quasi totalité des chaînes de transfert comme transporteurs liposolubles et mobiles d'électrons et de protons à travers la membrane, en associant la charge positive de deux protons avec la charge négative de deux électrons.

Les quinones sont réduites en hydroquinone en début de chaîne par les déshydrogénases, telles que la NADH déshydrogénase ou la succinate déshydrogénase puis réoxydées, par exemple par les complexes Rieske/*b*. Les quinones sont également réduites au niveau du site Q_i des complexes Rieske/*b* (cf. I.1.5). Elles participent au pompage de protons et à l'établissement du potentiel chimiosmotique, en liant deux protons du côté négatif de la membrane et en les relarguant du côté positif (cf. figure I.2).

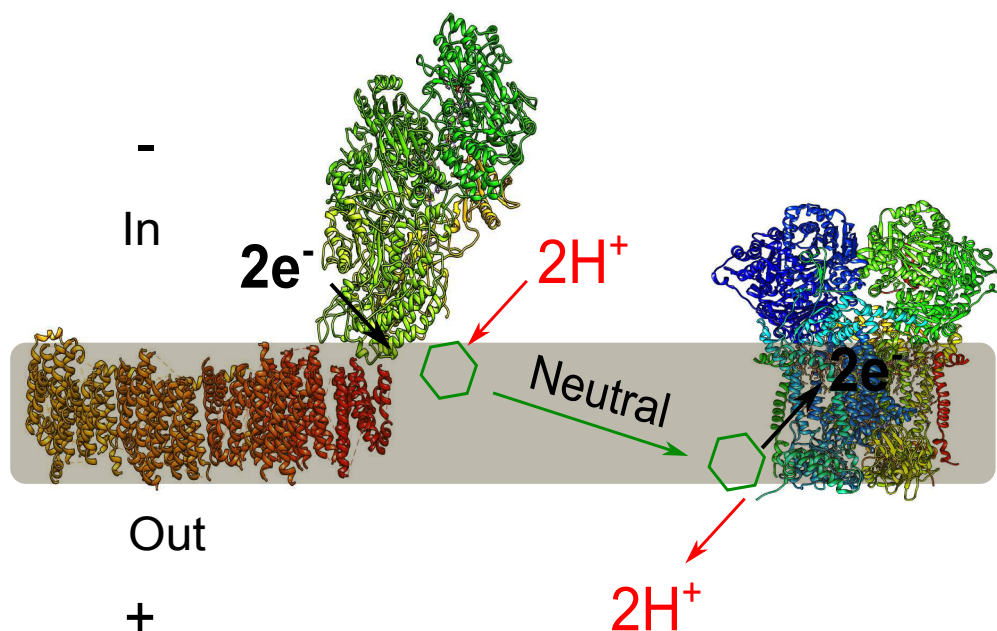
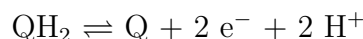


FIGURE I.2 – **Transport de protons et d'électrons par les quinones.** Les quinones sont réduites au niveau du site de liaison des quinones (site Q) du complexe I par deux électrons provenant du NADH et deux H^+ provenant du cytoplasme. La quinone réduite ou hydroquinone va diffuser à travers la membrane pour être oxydée au niveau du site Q_o du complexe Rieske/*b*, en cédant deux électrons et en relargant deux protons du côté externe de la membrane. À gauche, la NADH déshydrogénase de *Thermus thermophilus*, code PDB : 3M9S ; à droite, le complexe cytochrome bc_1 de *Saccharomyces cerevisiae*, code PDB : 2IBZ.

Une quinone transporte 2 électrons en association avec 2 protons :



Cependant, les groupes redox des complexes enzymatiques, comme les hèmes ou les centres Fe-S, ne peuvent généralement accepter qu'un électron à la fois. La quinone a la capacité de séparer sa réaction à deux électrons en deux réactions à un électron, entraînant l'apparition d'un intermédiaire réactionnel très réactif, une semiquinone (QH^\bullet ou $\text{Q}^{\bullet-}$, appelés SQ dans la suite de cette thèse), pouvant engendrer des ROS.

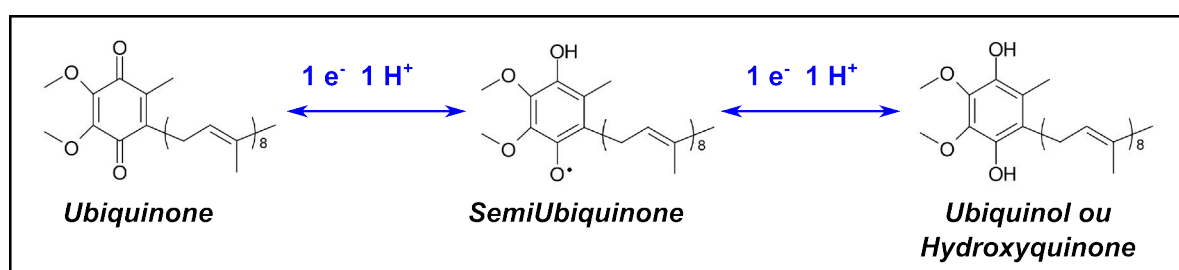


FIGURE I.3 – **Oxydation et réduction des quinones.** Intermédiaire semiquinone

Les quinones impliquées dans les chaînes de transfert bioénergétiques peuvent être classifiées en 2 catégories : les naphthoquinones et les benzoquinones, dont les principales différences se situent au niveau du potentiel redox.

Les quinones les plus anciennes sont probablement les naphthoquinones ou ménaquinones, présentes chez de très nombreuses bactéries et archées. Ces molécules sont considérées comme apparues sous une atmosphère anaérobie et possèdent un potentiel redox de -70 mV. L'augmentation de la concentration d' O_2 dans l'atmosphère il y a environ 2,5 milliards d'années, entraîne une augmentation du potentiel redox ambiant dans lequel évoluent les organismes. Les ménaquinones avec leur faible potentiel redox sont oxydées rapidement en présence d'oxygène, de plus l'intermédiaire ménasemiquinone est très instable, ce qui pose un problème au niveau du transfert d'électrons au sein des chaînes. Pour s'adapter à un milieu plus oxydant, les ménaquinones ont été remplacées dans au moins trois régions de l'arbre phylogénétique (cf. figure I.4) : en ubiquinone (chez certaines protéobactéries), en plastoquinone (chez les cyanobactéries), et en caldariellaquinone (chez les Sulfolobales). Ces quinones possèdent un potentiel redox plus élevé, ce qui les rend

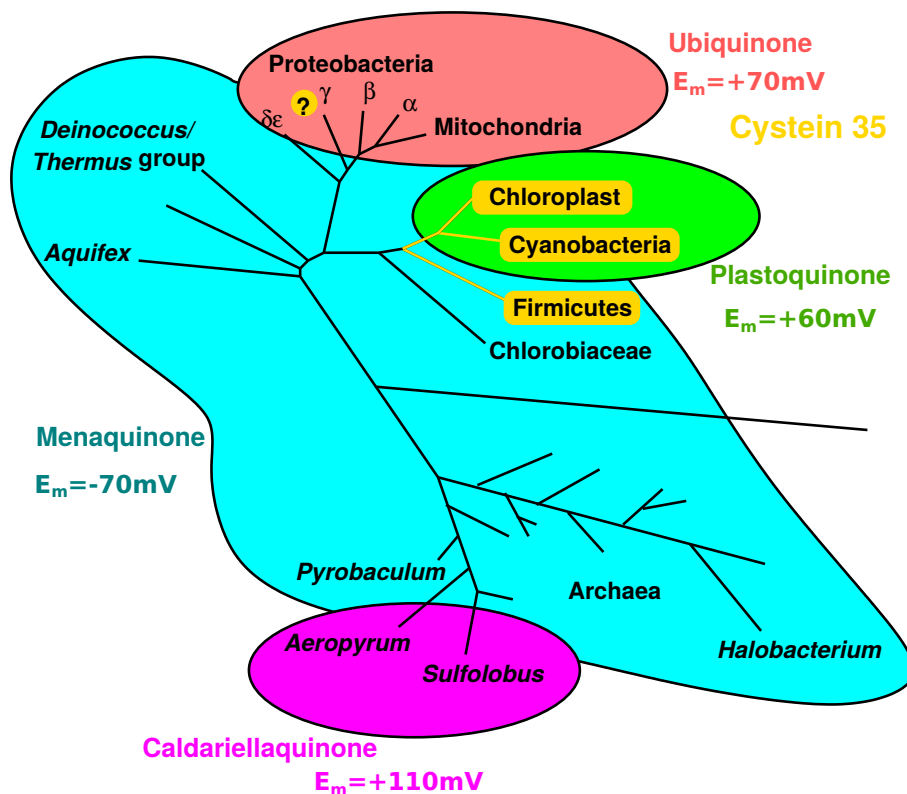


FIGURE I.4 – Représentation schématique d'un arbre phylogénétique des différentes quinones. L'arbre est basé majoritairement sur les séquences SSU de l'ARNr, modifié d'après Schütz *et al.* (2000).

plus stables en présence d'oxygène.

Une grande partie des organismes utilisant des ménaquinones possède un mécanisme anaérobie, mais chez certaines archées ou bactéries l'utilisation de ménaquinones persiste après le passage à un métabolisme aérobie, comme chez les bactéries du groupe *Bacilli*, auquel appartient *Bacillus subtilis* et *Geobacillus stearothermophilus*.

Le pool de quinones peut servir à changer de voie métabolique et joue un rôle central dans la régulation des CTE, notamment au niveau des chaînes branchées, comme chez de nombreux procaryotes possédant différentes oxydases terminales. Chez certains organismes comme *E. coli*, le changement de type de quinone permet le passage d'un mode aérobie avec l'utilisation d'ubiquinones à un mode anaérobie avec l'utilisation de ménaquinones (Ingledew et Poole, 1984).

Les cytochromes *c*

Les transporteurs d'électrons de type cytochrome *c* sont de petites protéines (autour de 10-12 kDa), solubles (comme chez la mitochondrie) ou ancrées à la membranes (chez certaines bactéries gram positive comme *G. stearothermophilus*), contenant un ou plusieurs

hèmes de type *c*. Elles sont présentes dans différents contextes physiologiques (respiration aérobie, ou dénitrification, photosynthèse...) et peuvent avoir plusieurs partenaires métaboliques, tels que les CcOx, les cytochromes *c* peroxydase, les sulfite oxydases, les nitrite réductases, etc... Dans les chaînes respiratoires, ils sont réduits au niveaux des complexes Rieske/*b* puis transportent les électrons jusqu'aux oxydases.

Quand ces protéines sont ancrées à la membrane, elles possèdent un linker flexible qui permet l'interaction avec les différents partenaires. Par exemple, *Paracoccus denitrificans* possède un cytochrome *c*₅₅₂ structuré en 3 domaines : un domaine N-terminal avec un segment transmembranaire servant à ancrer la protéine à la membrane, un linker très flexible contenant 40 résidus et un domaine globulaire de 100 résidus contenant un hème *c* lié covalamment par deux résidus cystéine (Rajendran *et al.*, 2010).

Si certains organismes sont dépourvus de cytochrome *c*, comme *Corynebacterium glutamicum* (Bott et Niebisch, 2003), d'autres en possèdent plusieurs types. C'est le cas de *Geobacillus stearothermophilus* et de *Rhodobacter spheroides*, qui possèdent deux types de cytochrome *c*. Chez *G. stearothermophilus*, les deux cytochromes : cyt *c*₅₅₀ et cyt *c*₅₅₁ interagissent chacun avec une oxydase différente, respectivement la CcOx *caa*₃ et la CcOx *bo*₃ (Wachenfeldt et Hederstedt, 1990).

NADH:quinone oxydoréductase

Une des bases du métabolisme oxydatif est la conversion du pouvoir réducteur présent dans les composés extraits de la nourriture en NADH (ou NADPH). Ce pouvoir réducteur est ensuite transmis au pool de quinone de la chaîne respiratoire, situé dans la membrane interne des mitochondries ou dans la membrane plasmique des bactéries et des archées.

Dans de nombreuses espèces, cette réaction est catalysée par trois groupes très différents de NADH déshydrogénases :

- Les NADH déshydrogénases de type NDH-2, aussi appelées NADH déshydrogénases "alternatives", qui n'utilisent pas l'énergie redox du couple NADH/NAD⁺ pour transloquer des protons supplémentaires.
- Les NADH déshydrogénases qui pompent des cations Na⁺ sont des Nqr. Ce sont des complexes membranaires uniquement présent chez les procaryotes.
- Enfin, les plus étudiées sont les NADH déshydrogénases de type NDH-1, présentes notamment dans certaines mitochondries, et aussi appelés complexes I. Ce sont des protéines membranaires complexes qui participent à l'établissement du gradient

électrochimique de protons.

Ces trois familles ont des origines évolutives indépendantes et possèdent des mécanismes réactionnels différents (Kerscher *et al.*, 2008), mais catalysent la même réaction d'oxydo-réduction : le transfert d'électrons du NADH à la quinone,



Image copyright

FIGURE I.5 – Localisation des trois familles de NADH déshydrogénase. **A** Les procaryotes peuvent contenir les trois types de NADH déshydrogénase. **B** Les mitochondries de champignons et de levures "aérobie stricte" peuvent contenir le complexe I et jusqu'à quatre types de NDH-2 différents qui peuvent être orientés sur les deux faces de la membrane interne. **C** Les mitochondries de levures fermentaires ne contiennent pas de complexe I mais jusqu'à trois sortes de NDH-2. **D** Les mitochondries des eucaryotes supérieurs ne contiennent que le complexe I. Issu de Kerscher *et al.* (2008)

NDH-2 Les NADH déshydrogénases alternatives sont des enzymes périphériques de membrane, composées d'une seule sous-unité et contenant une molécule de FAD. On les retrouve chez de nombreux procaryotes, mais également dans les mitochondries de divers organismes, notamment chez les plantes ou les champignons (Kerscher, 2000). Le transfert d'électrons n'est pas couplé à un pompage de protons à travers la membrane, et n'est donc pas électrogénique.

Chez les Eucaryotes ces enzymes sont associées à la membrane interne de la mitochondrie (cf. figure I.5). Certaines enzymes de cette famille utilisent également le NADPH comme substrat, certaines également nécessitent des ions calcium pour leur activité. Chez

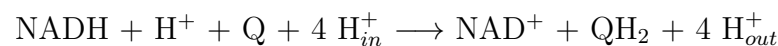
certaines espèces, comme *Saccharomyces cerevisiae*, le complexe I est absent, et une NDH-2 est en charge de transférer les électrons du NADH à la chaîne respiratoire.

G. stearothermophilus possède une NDH-2 au sein de sa chaîne respiratoire, ainsi qu'un homologue du complexe I translocateur de protons, mais dépourvu du module d'oxydation du NADH.

Nqr Certaines bactéries marines ou pathogènes (comme *Vibrio cholerae*) ainsi que certains extrêmophiles peuvent rencontrer des difficultés à former et entretenir un gradient de protons en raison des conditions environnementales. En effet, dans l'eau de mer, le pH externe est autour de 8, ce qui entraîne un gradient de proton ΔpH de part et d'autre de la membrane "opposé" au gradient de proton qui participe au $\Delta\mu_{H^+}$. Ces organismes possèdent un mécanisme de transduction d'énergie basé sur un gradient électrochimique de sodium, qui sert de source d'énergie pour de nombreux processus cellulaires comme la synthèse d'ATP.

Les complexes Nqr sont des protéines intégrales de membrane composées de 6 sous-unités : NqrA-NqrF codées par l'opéron nqr. Les sous-unités NqrB, NqrD et NqrE composent le domaine transmembranaire responsable de la translocation de Na^+ , les autres sous-unités forment le domaine soluble contenant les cofacteurs redox : centre Fe-S, FAD, et deux FMN (flavine mononucléotide).

NDH-1 Les complexes NDH-1 sont présents chez certaines bactéries et dans la vaste majorité des organismes eucaryotes, avec quelques exceptions tels que la levure *S. cerevisiae*. Ces enzymes jouent un rôle central dans la chaîne respiratoire, en couplant la réaction exergonique de transfert de 2 électrons du NADH à une quinone, à la translocation de 4 protons à travers la membrane.



Le complexe I présente une forme en L, avec une partie cytoplasmique où est situé le site d'oxydation du NADH, et une partie membranaire qui transloque les protons. Des similarités entre le bras soluble du complexe I et des enzymes du groupe 4 des NiFe hydrogénases, ainsi qu'entre la partie membranaire du complexe I et certaines sous-unités des Na^+/H^+ antiporteurs Mrp (pour "Multiple resistance to pH") suggèrent une apparition du complexe I par la fusion entre une hydrogénase réduisant le NAD^+ et d'un antiporteur Mrp-like (Marreiros *et al.*, 2013).

Les membres de la famille des NADH:quinone oxydoréductases font partie des plus gros complexes membranaires connus. Le complexe I de la mitochondrie de levure *Yarrowia lipolytica* contient 40 sous-unités pour un poids moléculaire de 946,5 kDa. La forme

minimale de l'enzyme chez les procaryotes contient 14 sous-unités formant un centre catalytique très conservé dans l'évolution (Kmita et Zickermann, 2013). Cette conservation observée entre les enzymes bactériennes et de mammifères témoigne d'un mécanisme réactionnel lui aussi préservé.

Le complexe I le mieux caractérisé structuralement est celui de *Thermus thermophilus*, le premier dont la structure complète a été résolue à haute résolution (3,3 Å) (Baradaran *et al.*, 2013). Ce complexe de 536 kDa contient 16 sous-unités différentes, avec un total de 64 hélices transmembranaires et 9 centres Fe-S. La figure I.6.B est une représentation

Image copyright

FIGURE I.6 – Mécanisme hypothétique de transfert de protons et d'électrons au sein du complexe I. (A) Transfert des électrons au niveau du domaine soluble. Le chemin des électrons est indiqué par les flèches bleues. La distance indiquée est la distance centre-à-centre, la distance bord-à-bord est notée entre parenthèses. Les électrons sont transmis du NADH à la FMN, puis transférés par la chaîne formée par les 7 centres Fe-S, jusqu'au site de liaison des quinones (site Q) à l'interface du domaine membranaire, où le centre N2 réduit la quinone. **(B)** Représentation schématique des hypothétiques changements conformationnels entre les deux principales conformations. L'énergie issue du transfert d'électrons du NADH à la quinone est transduite par un réseau de résidus polaires au sein de la membrane, indiqués sous forme de cercle : rouges pour Glu et bleu pour Lys/His. Les cercles noirs indiquent les résidus Pro conservés. D'après Sazanov *et al.* (2013).

schématique de son organisation :

- Le domaine cytoplasmique est composé de 8 sous-unités contenant les centres redox impliqués dans le transfert d'électrons : un centre FMN (flavine mononucléotide) suivi de 7 centres FeS, dont le dernier est supposé être le donneur d'électrons pour la quinone (Baradaran *et al.*, 2013). Le site de réduction de quinone se trouve à l'interface entre la membrane et le cytoplasme.

- La structure du domaine membranaire a révélé la présence de 7 sous-unités (Nqo12, Nqo13, Nqo14, Nqo10, Nqo11, Nqo7 et Nqo8). Les sous-unités Nqo12-14 forment des canaux à protons. Chaque sous-unité pompe probablement un proton par cycle catalytique.

Étonnamment, une longue hélice amphipatique est positionnée à cheval sur la quasi totalité du domaine transmembranaire et relie les sous-unités entre elles. Il a dans un premier temps été suggéré que cette hélice pouvait avoir un rôle dans le transport de protons (Efremov et Sazanov, 2011), en agissant comme un piston pour induire des changements conformationnels. Cependant les nouvelles données structurales et fonctionnelles tendent à montrer que ces changements seraient en fait réalisés par l'intermédiaire d'un axe central contenant des résidus chargés et polaires, localisés à proximité de zones flexibles des hélices (représentés sous forme de points de couleur dans la figure I.6.B). Le mécanisme de translocation des protons ainsi que le nombre de protons transportés par électron transféré est encore l'objet de débats.

Une structure à basse résolution (6 Å) d'un complexe I eucaryote, celui de la mitochondrie de levure *Yarrowia lipolytica* a été publié en 2010 (Hunte *et al.*, 2010).

succinate:quinone oxydoréductase

La superfamille des succinate:quinone oxydoréductases (SQOR) contient les enzymes de la chaîne respiratoire appelés complexes II. La classification au sein de cette famille est basée sur le sens de la réaction catalysée par l'enzyme *in vivo* :

- Les succinate:quinone réductases (SQR) assurent l'oxydation du succinate en fumarate, couplée à la réduction d'une quinone en quinol (ou hydroquinone).
- Les quinol:fumarate réductases (QFR) catalysent la réaction inverse

Les QFR et SQR sont des enzymes homologues ayant évoluées du même ancêtre commun, elles possèdent un fort taux d'identité de séquence et des similarités au niveau de leur structure (Cecchini, 2003). Les SQR sont impliquées dans le métabolisme aérobie et constituent également l'unique étape du cycle de Krebs associée à la membrane. Au contraire, les QFR participent à la respiration anaérobie avec le fumarate comme accepteur terminal d'électrons.

Les SQOR sont généralement composées de trois à quatre sous-unités (cf. figure I.7) :

- deux sous-unités hydrophiles A (SdhA) et B (SdhB), contenant des cofacteurs re-

dox : une flavine et trois centres fer-soufre ($[2\text{Fe-2S}]$, $[4\text{Fe-4S}]$ et $[3\text{Fe-4S}]$), contenant le site d'oxydation/réduction des dicarboxylates, au niveau de la sous-unité A.

- une (SdhC) ou deux (SdhC et SdhD) sous-unités membranaires contenant zéro, un ou deux hèmes de type *b*, ainsi que le site d'oxydoréduction des quinones.

Les sous-unités solubles sont fortement conservées au sein de la famille des SQOR, alors que les similarités de séquences des sous-unités membranaires sont bien plus faibles.

Dans le cas d'une chaîne respiratoire utilisant une quinone à haut potentiel, la différence de potentiel redox entre le succinate et l'ubiquinone est faible (potentiel du couple succinate/fumarate = +30 mV), et le ΔG issu de la réaction de transfert d'électron est trop faible pour permettre une translocation de protons à travers la membrane. Les SQR ne participent donc pas à l'établissement du potentiel transmembranaire. Pire encore, dans le cas d'une chaîne respiratoire utilisant un pool de quinone à bas potentiel, la réaction de transfert d'un électron du succinate à la quinone est défavorable, et l'énergie contenue dans la force protomotrice (*pmf*) est utilisée pour mener à bien la réaction. Pour cela le complexe Sdh contient deux hèmes *b* et réduit les quinones du côté periplasmique de la membrane tandis que les SQRs à ubiquinone ont un ou zéro hème et réduisent les quinones côté cytoplasmique. La prise des protons par la réduction des quinones est compensée par la libération des protons du succinate.

Image copyright

FIGURE I.7 – **Structure de la quinone:fumarate réductase de *E. coli*** (PDB : 1FUM). La sous-unité contenant la flavoprotéine (SdhA) est colorée en jaune, SdhB en brun, et les deux sous-unités membranaires SdhC et SdhD sont colorées en bleu. A droite, la distance bord à bord des cofacteurs est représentée. D'après Cecchini (2003)

Les complexes Rieske/cytochrome *b*

Les complexes Rieske/cytochrome *b* (ou Rieske/*b*) couplent le transfert d'électrons d'une hydroquinone à un cytochrome *c*, ou à une plastocyanine, à la translocation de

protons à travers la membrane, contribuant ainsi à l'établissement du gradient électrochimique de protons.

Ces enzymes, les seules à être communes à de nombreuses chaînes de transfert d'électrons respiratoires (aérobies et anaérobies) et photosynthétiques (Schütz *et al.*, 2000), constituent une large famille dont les représentants les plus étudiés sont les cytochromes bc_1 des mitochondries et des bactéries pourpres, et le cytochrome b_6f chloroplastique.

Ces enzymes possèdent un cytochrome b et une protéine de Rieske très conservés, notamment dans le site d'oxydation des quinones (Q_o). Pour comprendre l'origine évolutive de cette famille, on peut se baser sur l'arbre phylogénétique de la sous-unité b , présenté figure I.8.

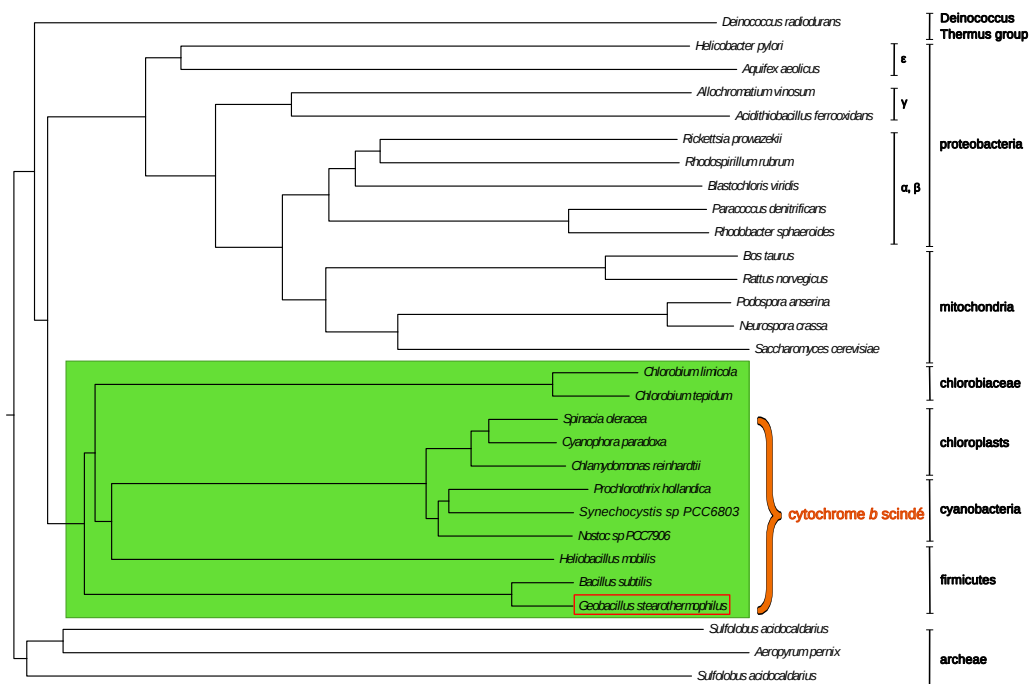


FIGURE I.8 – **Arbre phylogénétique des sous-unités cytochrome b et cytochrome b_6 -SU IV.** D'après Schütz *et al.* (2000).

Cette sous-unité est présente au sein de la famille sous deux formes : un polypeptide unique, ou suite à une scission du gène codant pour le cytochrome b , en deux polypeptides : la sous-unité b_6 et la sous-unité IV (SU IV). Une analyse phylogénétique des séquences de différents membres de la famille des Rieske/ b permet de visualiser un "nœud" commun au niveau duquel les groupes des cyanobactéries, des héliobactéries, les bactéries vertes sulfurées ainsi que d'autres groupes non photosynthétiques, possédant un cytochrome b scindé en deux sous-unités se retrouvent. Un certain nombre de marqueurs phylogéné-

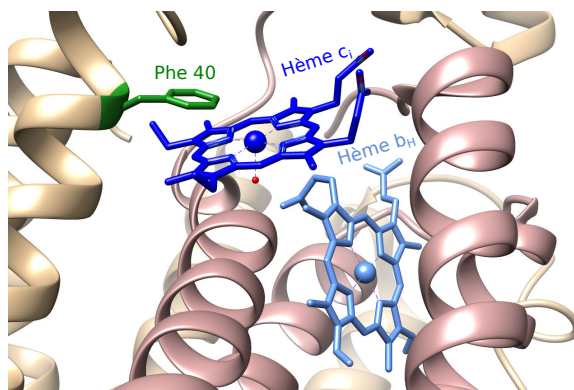


FIGURE I.9 – **L'hème c_i au sein du site Q_i .** L'hème c_i est lié covalamment à la sous unité b_6 (rose) par un pont thioéther avec la cystéine en position 35. Il est coordonné par une molécule d'eau (rouge). Un résidu Phe, en position 40 de la sous-unité IV (beige) pourrait servir de protection à l'hème. Modèle PDB : 1Q90.

tiques supportent l'hypothèse que ces bactéries forment un clade, nommé "green clade" par les auteurs de l'étude (cf. figure I.8). Cette classification observée au niveau des complexes Rieske/ b est identique à la classification obtenue à partir de l'ARN 16s dans tous les clades (à l'exception des Chlorobiacées) (Nitschke *et al.*, 2010).

A l'inverse, les sous-unités comportants un hème de type c , tels que le cytochrome c_1 du cytochrome bc_1 , le cytochrome f du cytochrome b_6f ou le cytochrome c du cytochrome b_6c , sont structuralement très différentes, et n'ont pas d'origine évolutive commune. Il est donc préférable de se référer à ces complexes par la nomenclature "Rieske/ b " plutôt que d'utiliser le terme de "complexe bc " qui peut induire en erreur d'un point de vue évolutif.

Les complexes de cette famille sont donc des homologues partiels : certaines sous-unités sont homologues et ont une origine évolutive commune, alors que d'autres sont analogues : elles n'ont pas d'origine commune mais remplissent la même fonction.

L'hème c_i

La résolution de la structure des cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii* (Stroebel *et al.*, 2003) et de *Mastidogladus laminosus* (Kurusu *et al.*, 2003) a révélé la présence d'un cofacteur supplémentaire dans le site Q_i du cytochrome b_6f , qui n'est pas présent dans le cytochrome bc_1 : l'hème c_i (cf. figure I.9).

Cet hème est lié covalamment par un pont thioéther à la Cystéine 35 de la sous-unité b_6 , ce qui en fait un hème de type c . Cependant, il présente des propriétés atypiques pour un hème c :

- il forme une unique liaison thioéther avec une cystéine, alors que la grande majorité des hèmes c sont tous liés par deux cystéines à la protéine (cf. figure III.43).
- La sous-unité b_6 ne contient pas la séquence caractéristique de liaison des hèmes de type c : CXXCH.
- De plus, cet hème est le seul hème c qui se trouve sur la face interne de la membrane, dans le site Q_i , à l'interface de la membrane et du stroma.
- Enfin, cet hème ne possède pas de ligand axial protéique, qui classiquement est une histidine ou une méthionine. Il est par contre coordonné par une molécule d'eau ou un ion hydroxide en 5^{ème} position, la 6^{ème} position de coordination restant libre, en face de la cavité inter-monomère, offrant la possibilité de lier des substrats en déplaçant la phénylalanine qui protège l'atome de fer (cf. figure I.10).

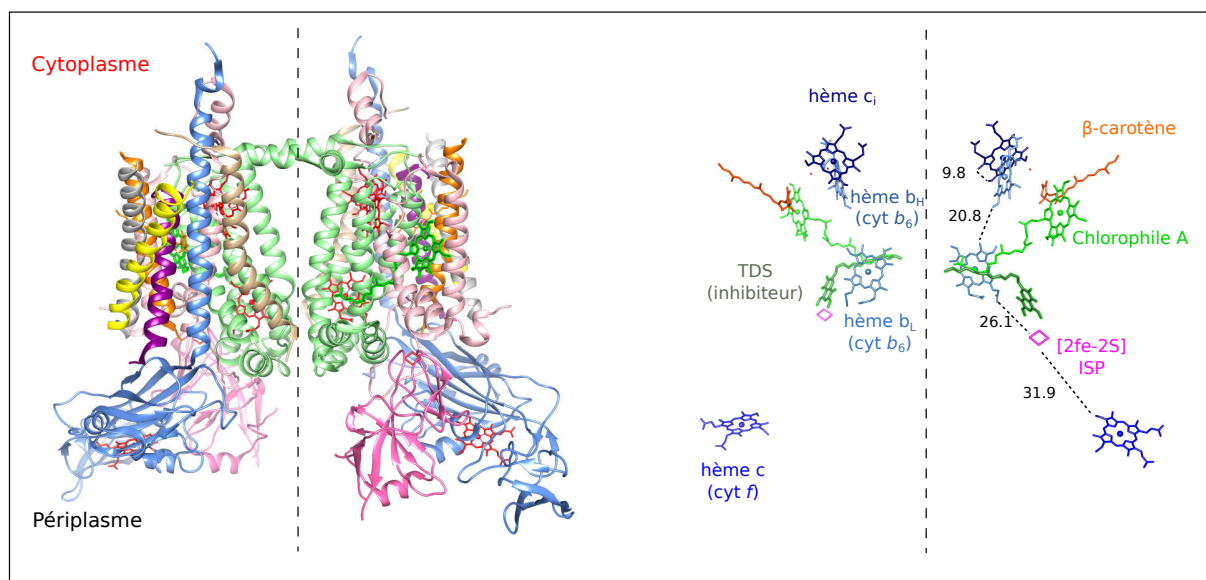


FIGURE I.10 – **Structure et organisation des cofacteurs au sein du complexe cytochrome b_6f .** **Gauche :** Structure d'un dimère de cytochrome b_6f en vue transversale à la membrane. Rieske : bleu ; SU IV : rose ; cyt b_6 : vert. Les hèmes sont représentés en rouge. **Droite :** Organisation des cofacteurs au sein du dimère. Les distances entre les centres métalliques (centres à centres) sont indiquées en Å. Modèle PDB : 1Q90.

C'est un hème pentacoordonné, de type haut spin, dont les électrons sont répartis dans des orbitales différentes (cf. figure I.11). Cette caractéristique lui confère des propriétés spectrales différentes de celles des autres hèmes présents dans les complexes Rieske/ b , qui sont bas spin. Le spectre optique d'un hème haut spin présente des bandes plus larges et plus difficiles à visualiser en présence d'hèmes bas spin. La spectroscopie RPE est une technique de choix pour étudier des hèmes haut spin.

La scission du cytochrome b en deux polypeptides est corrélée à la présence d'une cystéine en position 35 de la sous-unité b_6 , servant de ligand axial à l'hème c_i . Ce marqueur de la présence de l'hème c_i est présent chez de nombreux membres du "green clade",

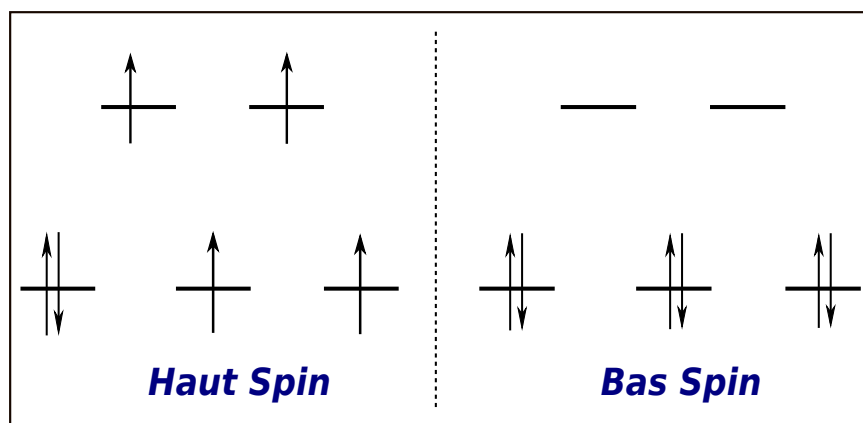


FIGURE I.11 – **Schéma de l'état de spin.** L'état de spin d'un atome dépend de l'organisation de ses électrons sur les orbitales d et résulte en deux états fondamentaux d'énergie : dans l'état bas spin, tous les électrons sont appariés (droite), dans l'état haut spin les électrons sont répartis dans des orbitales différentes (gauche). Appairer deux électrons sur la même orbitale requiert de l'énergie. Dans le cas de l'état haut spin, cette énergie est utilisée pour placer les électrons dans une orbitale de plus haute énergie. L'état haut spin possède une plus grande force magnétique, chaque électron non apparié agissant comme un aimant, alors qu'à l'état bas spin l'appariement des électrons entraîne une compensation de cette force.

cet hème se retrouve dans diverses chaînes de transfert d'électrons : photosynthétiques et respiratoires.

Bien que le site de fixation des plastoquinones au sein du cytochrome b_6f ne soit pas précisément défini, l'hème c_i est positionné entre l'hème b_H et la plastoquinone présente dans le site Q_i . De plus, la distance entre les deux hèmes est une des plus faibles distances reportées pour un couple d'hème au sein d'une protéine (9,8 Å). La participation de l'hème c_i au mécanisme réactionnel des complexes Rieske/ b (Q-cycle) est donc évidente. Cependant, le fait que le cytochrome bc_1 ne possède pas cet hème additionnel suggère un mécanisme de réduction des quinones différent de celui du cytochrome b_6f .

La fonction de l'hème c_i n'est pour l'instant pas comprise. Cependant plusieurs hypothèses sont envisagées :

1. Les hèmes c_i et b_H pourraient chacun stocker un électron, et ainsi permettre une réduction directe d'une molécule de plastoquinone, sans passer par un intermédiaire semi-quinone.
2. L'hème c_i pourrait aussi intervenir dans la stabilisation de la semiquinone au niveau du site Q_i .

L'intermédiaire semiquinone n'a jamais pu être observé au sein du site Q_i du cytochrome b_6f , soit en raison de son absence ou de son interaction avec l'hème c_i . En effet, il a été mis en évidence qu'un analogue de quinone, le NQNO pouvait se fixer à l'hème c_i du cytochrome b_6f de *chlamydomonas reinhardtii* (Baymann *et al.*, 2007) et de *M.*

laminosus (Yamashita *et al.*, 2007). En revanche, une semiquinone a pu être observée au sein du site Q_i du cytochrome bc_1 (Zhang *et al.*, 2007).

Le transfert des électrons au sein du complexe

Le mécanisme enzymatique a été décrit par Peter Mitchell sous l'appellation de Q-cycle en 1975 (Mitchell, 1975), puis a été ultérieurement adapté (Mitchell, 1976; Brandt et Trumpower, 1994) pour atteindre le schéma réactionnel utilisé aujourd'hui, et décrit en figure I.12. Si le mécanisme général de l'enzyme est connu, certains détails mécanistiques font encore l'objet de débats, notamment sur la séquence des événements au niveau du site Q_o .

Cette enzyme a un fonctionnement réversible, mais dans ce paragraphe la nomenclature utilisée correspond au transport des électrons vers le cytochrome c ("forward"), et non pas au transport dit "reverse".

Le complexe possède deux sites catalytiques distincts pour les quinones et les hydroquinones :

- Au sein du site Q_o l'hydroquinone est oxydée en quinone
- Au sein du site Q_i la quinone est réduite en hydroquinone

Q_o est situé du côté positif de la membrane, alors que Q_i est lui situé du côté négatif, la réduction d'une quinone au site Q_i et l'oxydation au site Q_o permet le pompage de 2 protons à travers la membrane par électron transféré.

Lors de l'oxydation de l'hydroquinone au site Q_o deux électrons sont transférés. Or les cofacteurs redox du complexe ne pouvant accepter qu'un électron à la fois, une des caractéristique cruciale du site Q_o et du Q-cyle est la bifurcation des électrons entre deux voies :

- Le premier électron est transféré par la voie dite "haut potentiel", via le centre $[2Fe-2S]$ de la protéine de Rieske puis vers le reste de la chaîne de transfert
- Le second électron est "recyclé", pour réduire une quinone dans le site Q_i , en suivant une voie dite "bas potentiel" via les hèmes b_L et b_H .

Cette bifurcation est rendue possible grâce à la capacité de la quinone de différencier le potentiel redox de ses deux électrons : un électron à haut potentiel sera transmis à la Rieske, et un électron bas potentiel qui sera transféré à l'hème b_L . Cette étape a été très étudiée et est toujours l'objet de discussions, notamment au niveau du caractère séquentiel ou concomitant des événements et de la régulation du transfert des électrons.

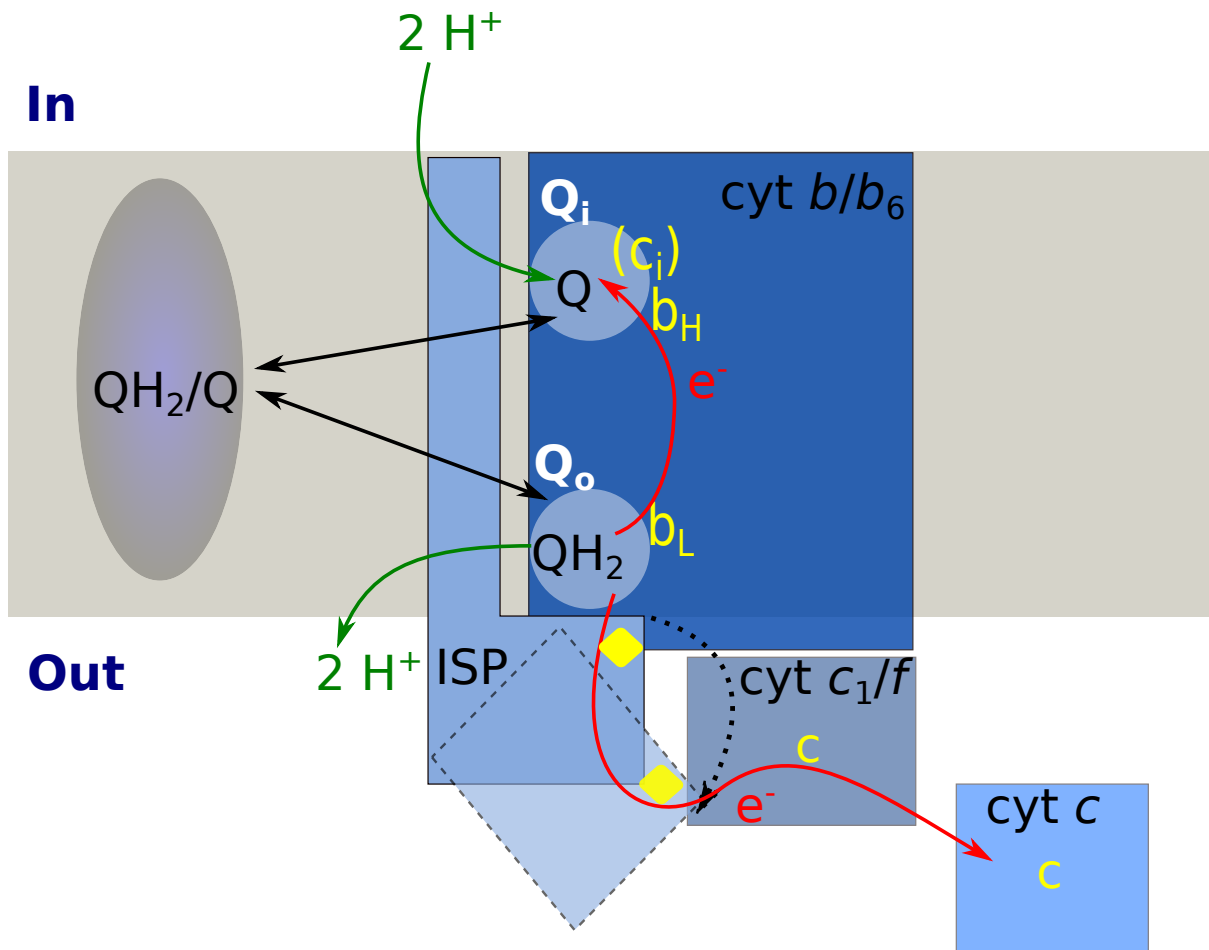


FIGURE I.12 – **Représentation schématique d'un complexe Rieske/cytochrome b .** Le pool de quinone au sein de la membrane est oxydé au niveau du site Q_o sur la face externe de la membrane. Les deux électrons issus de cette oxydation sont bifurqués entre la voie haut potentiel, passant par la protéine de Rieske puis l'hème c , vers le reste de la chaîne de transfert, et la voie bas potentiel, passant par les hèmes b (et l'hème c_i dans les organismes possédant cet hème supplémentaire), pour aller réduire une quinone au site Q_i . Les hèmes sont notés en jaune, et le centre FeS de la protéine de Rieske est un losange jaune. Le chemin des électrons est notifié par une flèche rouge, celui des protons par une flèche verte. La flèche noire en pointillés traduit le passage de la protéine de Rieske de sa position proximale à sa position distale, nécessaire pour transférer l'électron du site Q_o au cytochrome c .

Cette réaction se déroule en plusieurs étapes : le premier événement est le transfert du premier électron de l'hydroquinone au centre $[2Fe-2S]$ de la protéine de Rieske, en générant un intermédiaire semiquinone (SQ). C'est une réaction endergonique, qui est l'étape limitante du cycle catalytique de l'enzyme. Suite à ce transfert, la protéine de Rieske subit un changement conformationnel et se déplace pour assurer le transfert de l'électron à l'hème c de la sous-unité cytochrome c_1 (pour le cytochrome bc_1) ou f (pour le cytochrome b_6f). Le transfert du second électron, induit par l'oxydation de la semiquinone par les hèmes b de la voie bas potentiel, est une étape rapide. L'électron est transféré au site Q_i où il est utilisé pour réduire une quinone. Pour une revue sur le Q-cycle, voir Crofts *et al.* (2013).

La réaction d'oxydation de la quinone au niveau du site Q_o est une étape délicate, constituant une source majeure de ROS, car la semiquinone est une espèce hautement réactive, qui peut réagir avec l'oxygène. La particularité de ces complexes est qu'un même enzyme est en charge de l'oxydation et de la réduction du même substrat : une quinone. Pour cela, l'ensemble des groupes redox de l'enzyme doit posséder un potentiel redox finement adapté et adapté au potentiel de la quinone, comme nous le verrons lors de nos mesures de potentiel redox (cf. III.4).

Les oxydases terminales ou oxygène réductases

Les chaînes respiratoires aérobies utilisent l'oxygène O_2 comme accepteur terminal d'électrons. Cette réaction est effectuée par les O_2 réductases (O_2Rs) aussi connues sous le nom de cytochrome/quinol oxydases. Elles couplent la réduction d'une molécule d'oxygène en H_2O à la translocation de protons à travers la membrane, et participent à l'établissement du potentiel électrochimique.

Les analogies de structure et de séquence révèlent l'appartenance des O_2Rs à une famille plus large comprenant les nitrites oxydo-réductases (NORs). Le terme "Heme-copper oxidase" (ou HCO), souvent employé pour désigner les oxydases terminales, ne peut pas être utilisé pour cette famille, car les NORs ne possèdent pas d'atome de cuivre mais un fer dans le site catalytique.

En se basant sur les donneurs d'électrons et les types de substrats utilisés par les enzymes de la super-famille des NO/O_2 réductases, on peut distinguer 4 types d'enzymes :

- cNOR : cytochrome oxyde Nitrique Réductase
- qNOR : quinol oxyde Nitrique Réductase
- cO_2R : cytochrome Oxygène Réductase, ou CcOx : cytochrome *c* oxydase (utilisé comme appellation dans cette thèse.
- qO_2R : quinol Oxygène Réductase

Une classification basée sur les analyses de séquences permet l'obtention d'un arbre phylogénétique composé de 4 sous-groupes distincts : SoxM, SoxB, *cbb*₃ et les NORs (cf. figure I.13.A). Plusieurs classifications existent : une nomenclature "alphabétique" (A-, B- et C-ORs) a été introduite par Pereira *et al.* (2001), mais différencie moins les différents types d'oxydases sur un plan évolutif, contrairement à l'ancienne nomenclature qui, quant à elle, distingue bien les SoxM et SoxB des *cbb*₃, et ainsi reflète mieux la phylogénie. Il est intéressant de noter que la classification phylogénétique ne correspond pas aux différentes fonctions des réductases listées précédemment, en effet les SoxM(A-) et SoxB(B-)

Image copyright

FIGURE I.13 – **Arbre phylogénétique** (A) Vue générale schématique de l'arbre phylogénétique de la super famille des NO/O₂ réductases. (B) Zoom sur les O₂ réductases, certaines caractéristiques des enzymes sont décrites sur la figure. D'après Ducluzeau *et al.* (2014).

contiennent à la fois des quinols et des cytochromes oxydases. Trois branches de l'arbre contiennent les enzymes O₂Rs : SoxM-, SoxB- et *cbb*₃-réductases.

La figure I.13.B représente une phylogénie plus détaillée des O₂Rs. Alors que les qNOR et les cNOR présentent de nombreuses similarités et ne sont distinguées que sur la base du site d'interaction soit avec le cytochrome *c* soit avec l'hydroquinone, les trois clades d'O₂Rs présentent des architectures très diverses. Les O₂Rs semblent être apparues deux fois indépendamment à partir d'ancêtres apparentés à la familles des NORs, pour donner le groupe *cbb*₃ et le groupe de SoxB, depuis lequel sont ensuite apparus les SoxM.

Les enzymes du groupe *cbb*₃ possèdent une sous-unité particulière contenant un hème de type *c*, appelée CcoP. Au contraire, les deux groupes SoxB et SoxM possèdent un domaine extrinsèque appelé sous-unité II (SU II) contenant un "fold" cupredoxine très conservé.

Une différence majeure entre les SoxB et les SoxM se trouve au niveau des canaux existants pour acheminer les protons depuis le côté électronégatif de la membrane. Il a été montré à la fois par des études de mutagenèse et par la structure, que les SoxM possèdent 2 canaux de protons distincts : le K-channel et le D-channel, ayant respectivement un ré-

sidu lysine et un résidu aspartate dans leur site d'entrée. La résolution d'une structure de SoxB a montré l'existence d'un unique canal K-channel, bien conservé. Des alignements de séquences suggèrent que ce canal est également présent chez les *cbb*₃. Cette différence au niveau des canaux à protons pourrait induire une différence au niveau de la stœchiométrie de protons transférés.

L'arbre phylogénétique montre la transition depuis les SoxB jusqu'au groupe SoxM, par l'apparition du D-channel, commune à toutes les SoxM. Puis au sein des SoxM, on peut observer l'addition successive de sous-unités (SU III et SU IV), ainsi que l'insertion d'un domaine cytochrome de classe I à l'extrémité C-terminale de la sous-unité II, mais ces caractéristiques ne sont pas présentes chez tous les membres du groupe. Le groupe des SoxM peut alors être divisé en deux sous-groupes :

1. Un sous-groupe monophylétique dans les branches "hautes" de l'arbre, auquel appartient la CcOx *caa*₃ de *G. stearothermophilus*.
2. Un sous-groupe polyphylétique incluant divers clades, tels que les séquences thaumarchéales présentées sur l'arbre, présentant des caractéristiques "intermédiaires" entre les SoxB et les SoxM "supérieures".

Alors que les SoxM ont une faible affinité pour l'oxygène, les *cbb*₃ et les SoxB possèdent une forte affinité. La transition des SoxB vers les SoxM a certainement été initiée par l'augmentation de la quantité d'oxygène disponible, entraînant l'apparition du second canal de protons (D-channel) et en diminuant l'affinité de l'enzyme pour l'oxygène.

Le site catalytique Le site catalytique, aussi appelé BNC (pour bi-nuclear center) comprend un hème haut spin (pentacoordonné) et un centre cuivre Cu_B, le site de liaison du substrat se trouvant entre ces deux cofacteurs.

La réaction de réduction de l'O₂ nécessite 4 électrons et 4 protons pour former 2 molécules d'eau. Deux électrons sont fournis par l'hème pentacoordonné, un par le cuivre et un par un résidu tyrosine. La présence de ce résidu tyrosine dans le site actif, ponté avec le ligand histidine du cuivre Cu_B, est indispensable au fonctionnement de l'enzyme. Si on retrouve cette tyrosine à proximité du site actif chez toutes les O₂Rs, elle est placée à deux emplacements différents au niveau de la séquence : un emplacement noté Y^I pour les SoxM et SoxB, et Y^{II} pour les *cbb*₃ dans la figure I.13.B. Dans certaines branches des SoxB, on ne retrouve pas la présence de cette tyrosine (loss of Y, I.13.B), qui a probablement été substitué par un autre résidu tyrosine placé à un endroit différent de la séquence mais spa-

Image copyright

FIGURE I.14 – **Comparaison de structures de différents O_2Rs .** Structures d'enzymes représentatives des 5 principaux groupes composant la super-famille des NOR/ O_2R . La sous-unité catalytique est représentée en orange, et l'organisation du site actif est représentée au centre de la figure. D'après Ducluzeau *et al.* (2014).

tialement proche de Cu_B , ou cette enzyme a changé de fonction et ne réduit plus l'oxygène.

L'ATP synthase

Afin de permettre de nombreux processus métaboliques, l'ATP est hydrolysée en ADP et P_i , elle doit donc être constamment régénérée à partir de ces deux composés pour renouveler la source d'énergie cellulaire. L'importance de cette régénération peut être illustrée par la demande journalière en ATP, qui est de plus de 60 kg par jour pour un être humain moyen. La majorité de l'ATP est produite par l'ATP synthase F_0F_1 , au niveau des membranes bioénergétiques. Cette enzyme ubiquitaire ne fait pas partie, à strictement parler, de la chaîne respiratoire, mais utilise comme source d'énergie la relaxation du gradient électrochimique de protons établi par la CTE ($\Delta\mu_{H^+}$), et de ce fait est parfois appelée complexe V.

L'ATP synthase réalise même la réaction inverse de la chaîne respiratoire : quand cette dernière pompe des protons pour mettre en place un gradient électrochimique, l'ATP synthase catalyse la synthèse d'ATP grâce à l'énergie issue de la relaxation de ce gradient. L'activité optimale de l'ATP synthase nécessite une force protomotrice suffisante ($\Delta\mu_{H^+}$), composée à la fois du potentiel transmembranaire ($\Delta\psi$) et du gradient de protons (ΔpH).

L'ATP synthase peut également réaliser la réaction inverse et hydrolyser l'ATP lorsque $\Delta\mu_{H^+}$ devient insuffisant. Dans ce cas, l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP est utilisée pour pomper des protons contre leur gradient et participe à l'établissement du potentiel transmembranaire, indispensable outre la formation de l'ATP à des processus de transport et la motilité de certaines cellules.

L'ATP synthase peut être divisée fonctionnellement en un stator ($\alpha_3\beta_3\delta ab_2$) et un rotor ($\gamma\epsilon c_n$). Le stator est connecté à la membrane par un bras périphérique formé des sous-unités b et δ . Le rotor transmet par le bras central $\delta\epsilon$ l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. Les enzymes des mammifères contiennent des sous-unités supplémentaires, souvent situées dans ces bras reliant les deux rotors.

La catalyse de la création de la liaison pyrophosphate de l'ATP est réalisée grâce à un mécanisme rotationnel de changement de conformation de l'enzyme. Les trois entités $\alpha\beta$ du rotor F_1 sont capables de lier soit l'ATP, soit l'ADP et le P_i , soit encore de réaliser la conversion de l'un en l'autre, en fonction de la conformation dans laquelle elles se trouvent (cf. figure I.15.B). Celle-ci est elle-même déterminée par la rotation de l'anneau « c » provoquée par le passage des protons dans la sous-unité a de la partie F_0 . Il est alors induit un couplage mécanique par l'intermédiaire de la sous-unité γ et contre le cylindre $\alpha_3\beta_3$. Ce mouvement engendre des changements de conformations de la partie catalytique,

Image copyright

FIGURE I.15 – **(A) Organisation structurale d'une ATP synthase F_0F_1** , constructions d'après des structures issues de la PDB : l'anneau central c de *Ilyobacter tartaricus* (1CYE), le rotor F_1 (1JNV) et la sous-unité δ (2A7U) d'*Escherichia coli*, le bras périphérique de la mitochondrie de cœur de bœuf (2CLY), et la partie membranaire de la sous-unité b d'*E. coli* (1B9U). **(B) Cycle de fixation de l'ATP sur le rotor F_1 de l'ATP synthase** Cycle catalytique de l'ATP synthase, dans son activité d'hydrolyse de l'ATP, en vue schématique depuis « au-dessus » du trimère $\alpha_3\beta_3$. L'unité $\alpha\beta$ active dans la catalyse est représentée en rose, les unités inactives en bleu, et la pointe de l'axe γ en orange. D'après von Ballmoos *et al.* (2009).

permettant la synthèse d'ATP.

L'ATP synthase F_0F_1 est un gros complexe d'un poids moléculaire supérieur à 500 kDa, composé par :

- **Une partie extramembranaire** où a lieu la synthèse d'ATP, est composée des sous-unités $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$.
- **Une partie membranaire** est responsable de la translocation des protons à travers la membrane. Elle est composée des sous-unités ab_2c_{8-15} , selon les espèces. Il est remarquable que la stœchiométrie de l'anneau « c » soit variable d'une espèce à l'autre (10 sous-unités c chez *S. cerevisiae* et *E. coli*, 8 chez le boeuf, 14 dans l'enzyme chloroplastique, et 15 chez la cyanobactérie *Spirulina platensis*), car c'est elle qui détermine l'efficacité de synthèse de l'ATP par proton transloqué au travers de la membrane. Il pourrait s'agir d'une adaptation à des conditions physiologiques

différentes de phosphorylation de l'ADP (concentration en ADP, ATP et P_i , pH de la matrice mitochondriale, etc.) (von Ballmoos *et al.*, 2009).

Dans la membrane interne mitochondriale, l'ATP synthase s'organise en rangées de dimères, indispensables au maintien de l'ultrastructure des cristae mitochondriales (Habersehtzer *et al.*, 2013). L'isolement de ces dimères requière des conditions de solubilisation douces, pour éviter leur dissociation.

I.1.6 Les chaînes respiratoires procaryotes

Les procaryotes sont divisés en deux règnes : les archées et les eubactéries (ou bactéries). Quelques archées vivent dans des environnements extrêmes, avec des pressions et températures très élevées, des sources métaboliques diverses. Par exemple, *Sulfolobus acidocaldarius* vit dans des sources chaudes sulfureuses à des températures autour de 80°C et des valeurs de pH proches de 2. Certains environnements qualifiés d'"extrêmes" aujourd'hui reflètent probablement les conditions présentes dans le milieu primitif. Les eubactéries présentent également un groupe très large et diversifié, avec des organismes de forme et de taille variables, vivant dans de nombreux environnements, comme le sol, l'eau ou d'autres organismes sous forme commensale ou pathogène.

Les procaryotes possèdent une grande plasticité et flexibilité de leurs chaînes respiratoires ce qui leur permet de s'adapter à de nombreuses conditions métaboliques, et différents milieux. Leurs chaînes respiratoires sont souvent situées dans les membranes plasmiques, et le gradient électrochimique de protons s'établit entre le milieu intracellulaire et le milieu extra-cellulaire, ou périplasmique pour les bactéries gram négatives qui possèdent une double membrane.

Les chaînes respiratoires procaryotes sont souvent plus adaptables que celles retrouvées dans les mitochondries. En effet, la nécessité d'adaptation a façonné des chaînes plus modulables, avec différentes branches, souvent articulées autour du pool de quinone, comme chez *E. coli* où le passage du mode aérobie au mode anaérobie est couplé au type de quinone utilisé (Ingledew et Poole, 1984).

I.2 L'organisation en super-complexes

Le terme de "chaîne" respiratoire traduit la connexion nécessaire entre les différents complexes : l'accepteur d'électron d'un complexe est le donneur d'électrons du complexe suivant. Une question fondamentale est : comment se fait le lien entre les différents complexes de la chaîne respiratoire ? L'organisation structurale et fonctionnelle des chaînes

de transfert d'électrons, et notamment des chaînes respiratoires a été l'objet de débats depuis la découverte des premiers "pigments respiratoires" dans les années 40. De nombreuses théories ont été avancées, mais on retiendra principalement deux grandes théories sur l'organisation des chaînes de transfert.

I.2.1 Deux théories contradictoires

La théorie de l'"état liquide"

Selon la théorie dite de l'"état liquide" ou de "collision aléatoire" tous les complexes ainsi que les transporteurs d'électrons (quinones et cytochromes *c*) diffusent indépendamment les uns des autres dans la membrane. Les membranes bioénergétiques sont assez denses en protéines pour permettre de conserver des taux de réactions élevés sans que la diffusion soit limitante : les différents partenaires ont des probabilités de rencontre bien supérieures au temps moyen d'un turnover (Hackenbrock *et al.*, 1984). Des expériences de diffusion dans la membrane des complexes cytochrome *bc*₁ et cytochrome oxydase conjugués à des fluorophores ont été réalisées, montrant que les complexes diffusent latéralement dans la membrane, indépendamment l'un de l'autre (Hochli *et al.*, 1985). Cependant la principale donnée soutenant le modèle de collision aléatoire est le fait que tous les complexes de la chaîne respiratoire peuvent être purifiés séparément tout en gardant leur activité.

La théorie de l'"état solide"

Dans le modèle de l'état solide, les complexes des chaînes de transfert d'électrons sont physiquement liés, et organisés à un niveau supramoléculaire en super-complexes. La notion de super-complexe en elle-même est assez vague, on peut parfois entendre parler de super-complexe pour les gros complexes protéiques comme le complexe I ou l'ATP synthase. Cependant, il est généralement admis qu'un super-complexe est un assemblage de plusieurs complexes actifs individuellement, et non un complexe isolé, même si le complexe I mitochondrial possède un poids moléculaire plus élevé que de nombreux super-complexes.

Déjà dans les années 80, des études de biochimie ont révélé la présence de super-complexes chez différents procaryotes (Sone *et al.*, 1987; Berry et Trumpower, 1985), pour une revue sur les super-complexes procaryotes voir Magalon *et al.* (2012). Cependant la thématique de l'association supramoléculaire des complexes respiratoires a refait surface de manière très nette depuis les années 2000, à partir de publications rapportant l'isolement d'assemblages de haut poids moléculaire depuis les mitochondries de levure et de bœuf (Schägger et Pfeiffer, 2000a; Cruciat *et al.*, 2000). Au cours de ces études,

Image copyright

FIGURE I.16 – **Structures de super-complexes mitochondriaux résolus par microscopie électronique (Gauche :)** Super-complexe de mitochondrie de cœur de bœuf. Le docking de structure PDB dans l'enveloppe à 20 Å permet d'observer une stœchiométrie $I_1III_2IV_1$. D'après Althoff *et al.* (2011). **(Droite :)** Super-complexe de mitochondrie de levure *S. cerevisiae*. Le docking de structure PDB dans l'enveloppe à 20 Å traduit une stœchiométrie III_2IV_2 . D'après Mileykovskaya *et al.* (2012)

des membranes bioénergétiques ont été solubilisées à l'aide de détergents doux, comme la digitonine, afin de conserver les assemblages supra-moléculaires, puis analysés par électrophorèse bi-dimensionnelle (2D) :

1. Une première étape de migration, en condition native, permet de préserver les structures des protéines ainsi que les interactions inter-complexes.
2. Une seconde migration, en présence de SDS en condition dénaturante entraîne la séparation des différentes sous-unités formant les complexes.

Si les gels natifs se révèlent une technique intéressante pour l'étude des super-complexes, il convient d'analyser leur résultats prudemment. En effet, de nombreux artefacts peuvent intervenir lors de la migration et fausser les résultats (agrégation ou dissociation des assemblages supra-moléculaires).

A ce jour, si plusieurs structures de super-complexes ont été résolues à basse résolution en utilisant la microscopie électronique (de mitochondrie de levure *S. cerevisiae* : Mileykovskaya *et al.* (2012); Dudkina *et al.* (2011); de mitochondrie de cœur de bœuf : Althoff *et al.* (2011), le complexe PSII-LHCII de *C. reinhardtii* à 13 Å de résolution Drop *et al.* (2014), cf. figure I.16), aucune structure à haute résolution n'est disponible.

Les interactions régissant la formation des super-complexes ne sont pas comprises. Cependant, plusieurs études pointent le rôle fondamental des lipides dans ces interactions, comme dans Bazán *et al.* (2013), où les auteurs ont réussi à ré-associer le super-complexe III_2IV_2 de mitochondrie de levure à partir de complexes isolés et de cardiolipine.

Il semble que l'existence de nombreux types de super-complexes au sein d'une même chaîne de transfert d'électrons soit possible. Cependant les conditions d'extraction et d'isolement de ces complexes restent déstabilisantes et pour l'instant l'état d'organisation de ces complexes *in vivo* n'est pas encore totalement compris. Les données récentes issues de tomographie sur mitochondries entières ou chloroplastes (Davies *et al.*, 2011) devraient faire avancer la réflexion.

I.2.2 Les super-complexes, pour quoi faire ?

La raison de l'organisation des CTE en super-complexes n'est pas connue à l'heure actuelle. Plusieurs hypothèses sont avancées, d'ordre structurales ou fonctionnelles.

- **Rôle fonctionnel : cinétique de transfert** (Trouillard *et al.*, 2011)

F. Rappaport et M. Trouillard ont développé une nouvelle méthode d'étude de

la cinétique de transfert d'électron *in vivo* chez la levure, qui peut être appelée "flash-induced respiration". Cette technique est basée sur l'inhibition réversible de la CcOx par le monoxyde de carbone (CO) : le CO se fixe sur l'hème haut spin réduit, en empêchant l'accès de l'oxygène à l'hème. Le CO peut être photodissocié par un flash laser, ce qui permet une refixation rapide de l'oxygène et une reprise du transfert d'électron au sein de la chaîne.

En se basant sur cette technique, les auteurs ont développé une méthode permettant de suivre le transfert des électrons non seulement au sein de l'oxydase terminale mais également tout au long de la CTE. Les études sur l'oxydation du cytochrome *c* ont permis de montrer que la présence ou non d'un super-complexe n'impacte pas la cinétique d'oxydation de cette molécule, et donc que le cytochrome *c* ne participe pas au super-complexe dans la levure. De plus, sa diffusion n'est pas limitée, ce qui pousse à s'interroger sur l'intérêt fonctionnel de la formation de super-complexes. Dans les levures, la CTE se comporte comme un système homogène, fonctionnant dans des échelles de temps de centaines de millisecondes. La déstabilisation que se soit de la structure des cristae de la mitochondrie ou de l'association en super-complexe n'impacte pas les résultats obtenus avec la méthode de "flash-induced respiration".

- **Rôle fonctionnel : modulation des chaînes de transfert** (Lapiente-Brun *et al.*, 2013)

Des études de génétique sur des cellules de fibroblastes de souris ont mis en évidence l'existence de différentes populations de super-complexes respiratoires mitochondriaux. La formation et la dissociation de ces complexes est un phénomène dynamique qui peut être contrôlé par la source de carbone apportée à la cellule. La formation de super-complexes est un mécanisme d'adaptation pour les cellules, afin de varier le type de source de carbone utilisée (dans le cas de la mitochondrie, les sources de carbones telles que le glutamate ou le malate entraînent une production de NADH, alors que le succinate induit la production de FAD).

- **Rôle structural : organisation des membranes** (Davies *et al.*, 2011).

La cryotomographie a été utilisée pour observer des mitochondries entières provenant de différents organismes (cellules mammifères, champignons, etc...), permettant l'étude de l'organisation des complexes au sein des membranes. De longues rangées de dimères d'ATP synthases ont été observées au niveau des crêtes des cristae. En revanche, le complexe I, identifiable grâce à sa forme de "L", a lui été retrouvé au niveau des parties plates des cristae. L'organisation de ces deux complexes

est identique dans toutes les espèces observées, et semble structurer l'architecture des membranes mitochondriales. Les auteurs avancent l'hypothèse de l'implication des super-complexes dans la structuration des membranes mitochondriales, et par ce biais, l'établissement de la *pmf*, en provoquant une augmentation du ΔpH local au niveau des cristae (cf. figure I.17).

- **Rôle structural : organisation des membranes (2)**

Les membranes, notamment les membranes bioénergétiques, sont très densément chargées en protéines (Kirchhoff, 2014). Des phénomènes de ségrégation peuvent intervenir et un regroupement des protéines de même nature est alors observé au sein de la membrane. La formation de super-complexes peut être envisagée comme une stratégie mise en place par la cellule pour éviter cette ségrégation et maintenir les différents complexes participant au transfert d'électron dans une même zone de la membrane.

De récentes études de microscopie de fluorescence chez *E. coli* (Llorente-Garcia *et al.*, 2014) confirment cette hypothèse en montrant l'organisation des protéines de la chaîne respiratoire sous forme de patches dans la membrane. Ces patches sont formés des mêmes protéines, et non de différents partenaires de la chaîne de transfert d'électrons, qui sont associées faiblement, ne formant pas d'associations supra-moléculaires précises et ne correspondant pas à ce qu'on pourrait définir comme un super-complexe. La diffusion des ubiquinones dans la membrane permet un transfert d'électron efficace et un bon fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Cependant, la chaîne respiratoire de *E. coli* ne possède pas de complexe Rieske/*b* (complexe *bc*), entraînant une réaction à 2 partenaires enzymatiques : une déshydrogénase et une oxydase, reliées par une molécule de quinone. Dans ce cas de figure, la diffusion de la quinone ne semble pas limitante et la cinétique de transfert des électrons entre le donneur d'électron et l'accepteur final n'est pas impactée. Cependant, dans un système comprenant un complexe Rieske/*b* (comme chez les mitochondries, et une très grande majorité de bactéries et d'archées), l'ajout d'un troisième partenaire à la chaîne de transfert peut compliquer la situation, et dans ce cas, la diffusion nécessaire de 2 molécules (une quinone et un cytochrome *c*) pourrait devenir cinétiquement limitante, et l'organisation en super-complexe serait alors nécessaire pour maintenir un transfert efficace.

L'organisation en super-complexe favorise la diffusion des petites molécules comme les quinones, car une membrane organisée en super-complexes peut présenter moins d'obstacle (mais de plus grande taille) que des complexes isolés (Kirchhoff, 2014).

Image copyright

FIGURE I.17 – **Organisation moléculaire des cristae mitochondriales** Les ATP synthases et les complexes I sont localisés dans des régions différentes des cristae. Les ATP synthases forment des rangées de dimères (en jaune) sur les crêtes, alors que les complexes (en vert) de la CTE qui pompent les protons sont situés à proximité, au niveau des parties plates des cristae. Les protons (en rouge) transloqués à travers la membranes sont transportés vers la matrice par les ATP synthases, entraînant la production d'ATP. D'après Davies *et al.* (2011).

I.3 Le super-complexe de la chaîne respiratoire de *G. stearothermophilus*

L'objet de cette thèse est l'étude d'un super-complexe cytochrome $b_6c:CcOx$ caa_3 entre le complexe Rieske/ b et une oxydase de la chaîne respiratoire d'une bactérie gram positive : *Geobacillus stearothermophilus*. Dans cette section, nous tenterons d'expliquer le choix de notre objet d'étude ainsi que ses particularités.

I.3.1 *Geobacillus stearothermophilus* : une bactérie thermophile

Geobacillus stearothermophilus est une bactérie gram positive appartenant au phylum des firmicutes. Au sein des firmicutes, on peut distinguer deux groupes en fonction du contenu en bases guanine et cytosine de leur génome : les "low-GC" et les "high-GC". *G. stearothermophilus* appartient au groupe des "low-GC". C'est une thermophile modérée, avec une croissance entre 45° C et 70° C, et qui peut former des spores lorsque le milieu lui est défavorable.

Cette bactérie est utilisée comme source d'enzymes thermostables pour l'industrie (McMullan *et al.*, 2004), mais aussi en biochimie, où de nombreuses de ces enzymes sont exprimées dans *E. coli* afin de déterminer leur structure. Le génome de *Geobacillus kaustophilus* a été séquencé (Japan Marine Science and Technology Centre), et a été utilisé

lors de notre étude pour identifier les protéines par spectrométrie de masse.

La chaîne respiratoire de *G. stearothermophilus* est très proche de celle de *Bacillus subtilis*, un organisme mésophile (croissance à 37° C) également utilisé au laboratoire pour l'étude de son complexe cytochrome b_6c . Cependant des études préliminaires ont montré que le super-complexe présent chez *B. subtilis* était beaucoup plus instable que celui de *G. stearothermophilus*. Il est généralement observé que les protéines des organismes thermophiles sont plus stables que celles des mésophiles, mais la composition en lipide de *G. stearothermophilus* devrait également jouer un rôle important dans la stabilisation du super-complexe.

I.3.2 Le super-complexe cytochrome b_6c : CcOx caa_3

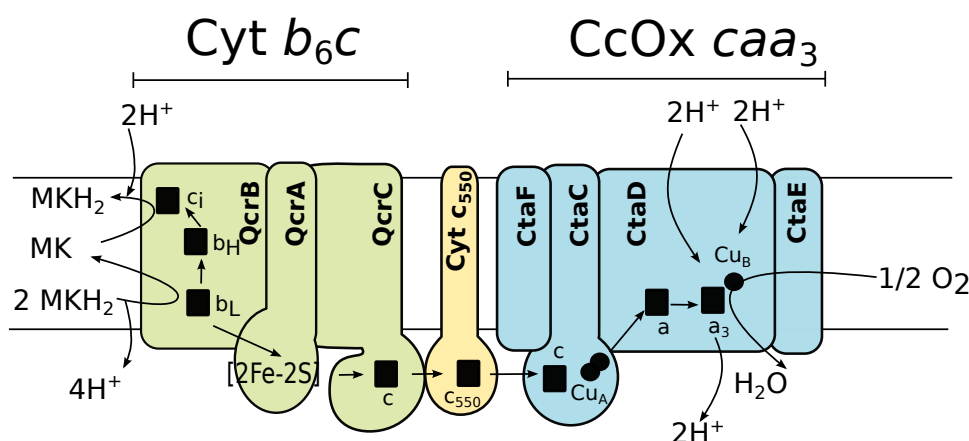


FIGURE I.18 – Schéma hypothétique du super-complexe de *Geobacillus stearothermophilus*. Au cours de notre étude, nous avons montré la présence du cytochrome c_{550} au sein du super-complexe. ■ : hèmes ; ● : cuivre.

En 1987, N. Sone a démontré la présence d'un super-complexe entre ce qu'il appelait à cette époque le cytochrome bc_1 (cytochrome b_6c) et une oxydase, au sein de la chaîne respiratoire de *Bacillus sp. PS3* (Sone *et al.*, 1987). Cette bactérie, provenant des sources chaudes du Japon, est phylogénétiquement très proche de *G. stearothermophilus*. On peut donc se servir de cette étude comme base de réflexion pour commencer notre travail sur le super-complexe de *G. stearothermophilus*.

N. Sone a isolé ce super-complexe par différentes techniques comme la co-immunoprécipitation, la chromatographie échangeuse d'ions, l'électrophorèse sur gel d'acrylamide et la chromatographie d'exclusion de taille.

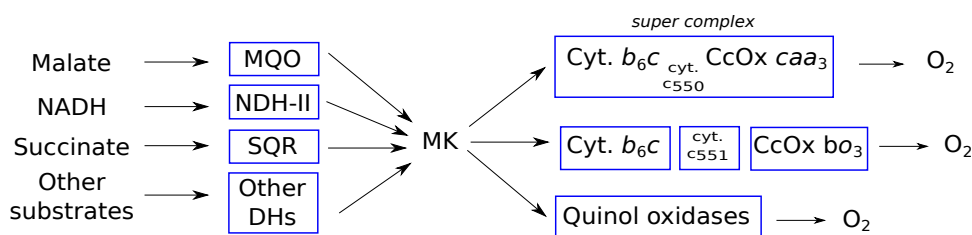


FIGURE I.19 – Schéma de la chaîne respiratoire de *Geobacillus stearothermophilus*. Schéma adapté de Kabashima *et al.* (2012). MK : ménaquinone.

I.3.3 La chaîne respiratoire de *G. stearothermophilus*

Geobacillus stearothermophilus possède une chaîne respiratoire aérobie, transférant les électrons depuis des composés réducteurs jusqu'au couple O_2/H_2O . Comme les autres membres des genres *Bacillus* et *Geobacillus*, il utilise une quinone à bas potentiel, la ménaquinone 7 (MK-7) (Nazina *et al.*, 2001).

La chaîne respiratoire de *G. stearothermophilus* est composée de nombreuses enzymes, dont l'expression est régulée selon les conditions de croissance de la bactérie. L'entrée des électrons au sein de la chaîne peut se faire via différentes enzymes et substrats (cf. figure I.19), et l'oxygène peut être réduit par différentes oxydases à partir de cytochrome *c* ou d'une quinone. L'articulation entre les différentes voies métaboliques se fait autour du pool de quinone.

Le cytochrome cytochrome b_6c

Le cytochrome b_6c est une enzyme de la chaîne respiratoire, phylogénétiquement plus proche du cytochrome b_6f photosynthétique que du cytochrome bc_1 mitochondrial. Ce complexe est constitué de trois sous-unités, codées par le même opéron au sein du génome bactérien (cf. table I.1) : une sous-unité b_6 contenant 4 hélices transmembranaires, une sous-unité IV (de 3 hélices transmembranaires) fusionnée à la sous-unité cytochrome *c* (SU IV-*c*) et la protéine de Rieske. Le site Q_i est formé par les sous-unités b_6 et SU IV-*c*, alors que le site Q_o est constitué de ces mêmes sous-unités et de la protéine de Rieske.

Le cytochrome b_6c possède une cystéine en position équivalente à la position 35 de la sous-unité b_6 du cytochrome b_6f de *C. reinhardtii*, qui est le ligand de l'hème c_i . On s'attend donc à la présence d'un hème haut spin de type c_i également dans le cytochrome b_6c . Cependant, la modélisation du site Q_i associée à des alignements de séquence suggèrent un environnement de l'hème différent de celui du cytochrome b_6f (cf. figure I.21), avec notamment la présence d'un hypothétique ligand axial protéique : un résidu glutamate (Ducluzeau *et al.*, 2008).

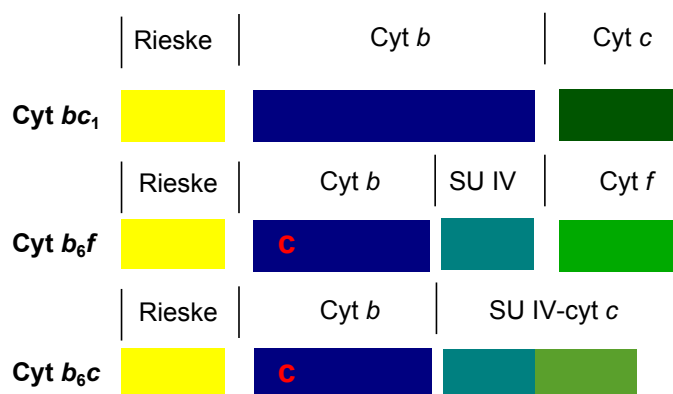


FIGURE I.20 – **Organisation génétique de l'opéron Rieske/cytochrome *b*** d'après les informations obtenues dans Schütz *et al.* (2000).

Gène	Sous-unité	Poids moléculaire	Cofacteurs Redox
<i>qcrA</i>	Rieske	19,3 kDa	[2Fe-2S]
<i>qcrB</i>	<i>b</i> ₆	25,4 kDa	hèmes <i>b</i> _H , <i>b</i> _L , <i>c</i> _i
<i>qcrC</i>	SU IV- <i>c</i>	27,9 kDa	hème <i>c</i>

TABLE I.1 – **Composition en sous-unités du cytochrome *b*₆*c***. L'hème *c*_i se trouve entre le *b*₆ et la SU IV-*c*, mais est lié covalamment à une cystéine du cyt *b*₆.

Peu de données biochimiques sont disponibles sur ce complexe. Des comparaisons avec l'hème *c*_i de *Heliobacillus mobilis* et *Heliobacterium modesticaldum* (Ducluzeau *et al.*, 2008), ainsi qu'avec l'hème *c*_i de *C. reinhardtii* (Baymann *et al.*, 2007) et de *Mastigocladus laminosus* (Zhang *et al.*, 2004) pourront être utilisées comme bases pour l'étude de l'hème *c*_i du cytochrome *b*₆*c*.

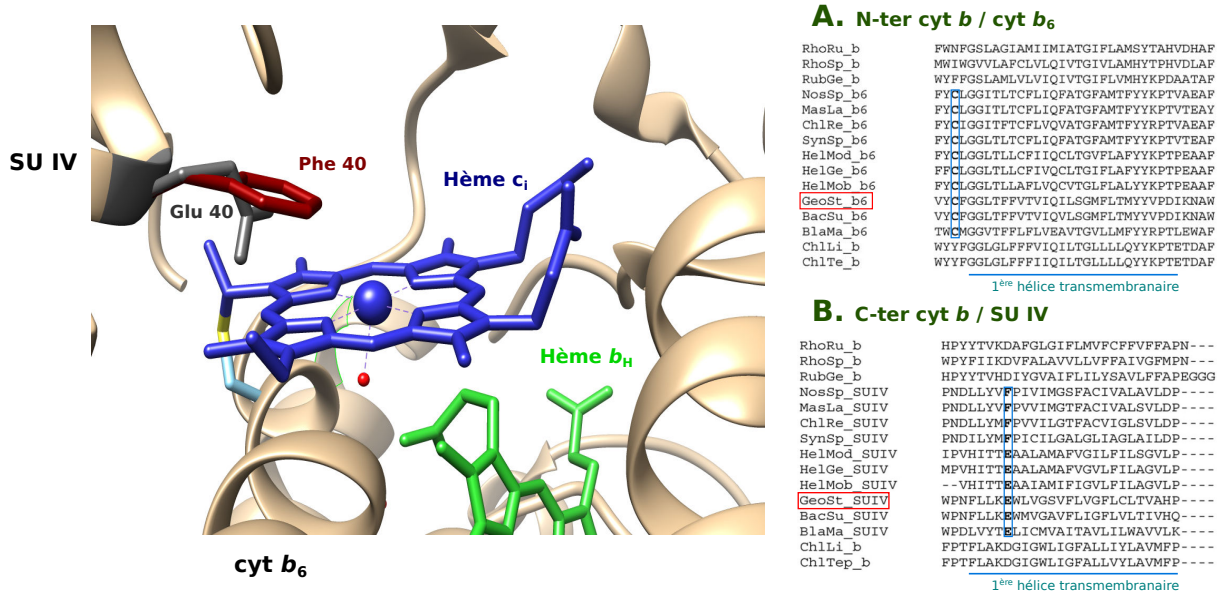


FIGURE I.21 – Prédiction de l'environnement du site Q_i de *G. stearothermophilus*. **Gauche** : Comparaison de l'environnement de l'hème c_i chez *Chlamydomonas reinhardtii*, qui possède une Phénylalanine en position 40 (rouge foncé) et *G. stearothermophilus* chez qui ce résidu pourrait être substitué par un Glutamate (gris). L'hème c_i est représenté en bleu. **Droite** : séquences de cytochromes b de différents organismes. (A) : première hélice transmembranaire de la partie N-ter du cyt b , correspondant à la sous-unité b_6 dans le cas d'un cyt b splitté. (B) première hélice transmembranaire de la partie C-ter du cyt b , correspondant à la sous-unité IV dans le cas d'un cyt b splitté. Les séquences suivantes ont été utilisées : RhoRu : *Rhodospirillum rubrum* (gi|83591703), RhoSp : *Rhodobacter sphaeroides* (gi|77464971), RubGe : *Rubrivivax gelatinosus* (gi|14165195), NosSp : *Nostoc sp. PCC 7120* (cyt b_6 : gi|17230913, SUIV : gi|17230914), MasLa : *Mastigocladus laminosus* (cyt b_6 : gi|46395687, SUIV : gi|48425904), ChlRe : *Chlamydomonas reinhardtii* (cyt b_6 : gi|41179010, SUIV : gi|41179004), SynSp : *Synechocystis sp. PCC 6803* (cyt b_6 : gi|16331351, SUIV : gi|16331352), HelMo : *Heliobacterium modesticaldum* (cyt b_6 : gi|167629366, SUIV : gi|167629367), HelGe : *Heliobacterium gestii* (cyt b_6 : gi|29839407, SUIV : gi|7715540), HelMo : *Heliobacillus mobilis* (cyt b_6 : gi|29839424, SUIV : gi|3820547), GeoSt : *Geobacillus stearothermophilus* (cyt b_6 : gi|1096738, SUIV : gi|1096739), BacSu : *Bacillus subtilis* (cyt b_6 : gi|16079312, SUIV : gi|16079311), BlaMa : *Blastopirellula marina* (cyt b_6 : gi|87308976, SUIV : gi|87308977), ChlTe : *Chlorobium tepidum* (gi|21673142), ChlLi : *Chlorobium limicola* (gi|67918859). D'après Ducluzeau *et al.* (2008).

La cytochrome c oxydase (CcOx) *caa*₃

La CcOx *caa*₃ est considérée comme l'archétype des enzymes du groupe SoxM (type A) des enzymes de la famille des O₂Rs (Ducluzeau *et al.*, 2013). La première structure d'une CcOx *caa*₃ est celle de *Thermus thermophilus*, résolue en 2012 (Lyons *et al.*, 2012), par cristallographie à partir de phases cubiques de lipides à une résolution de 2,36 Å.

Cette enzyme est composée de quatre sous-unités :

- **La sous-unité I** codée par le gène *ctaD*, contient un hème *a* bas spin ainsi que le site catalytique formé d'un centre binucléaire Cu_B et d'un hème haut spin *a*₃
- **La sous-unité II** codée par le gène *ctaC*, comporte un domaine cupredoxine comme toutes les enzymes de la famille des SoxM, mais également le centre binucléaire Cu_A, ainsi qu'un domaine cytochrome *c* additionnel fusionné à la sous-unité II, qui est alors appelée IIc.
- **La sous-unité III** est une sous-unité transmembranaire, codée par le gène *ctaE* est fusionnée avec la sous-unité I chez *Thermus thermophilus* , mais ce n'est pas le cas chez *Geobacillus stearothermophilus*.
- **La sous-unité IV** codée par le gène *ctaF* contient deux hélices transmembranaires situées le long de la sous-unité I.

Lorsqu'un électron est transféré du cytochrome *c* à l'oxydase, il transite d'abord par l'hème *c* de la SU II , puis par Cu_A et l'hème *a* avant d'arriver au site actif.

Gène	Sous-unité	Poids moléculaire	Cofacteurs Redox
<i>ctaD</i>	SU I	69 kDa	hèmes <i>a</i> et <i>a</i> ₃ , Cu _B
<i>ctaC</i>	SU II	40,1 kDa	hème <i>c</i> , Cu _A
<i>ctaE</i>	SU III	23,3 kDa	-
<i>ctaF</i>	SU IV	12,3 kDa	-

TABLE I.2 – Composition en sous-unités de la CcOx *caa*₃ de *Geobacillus stearothermophilus*.

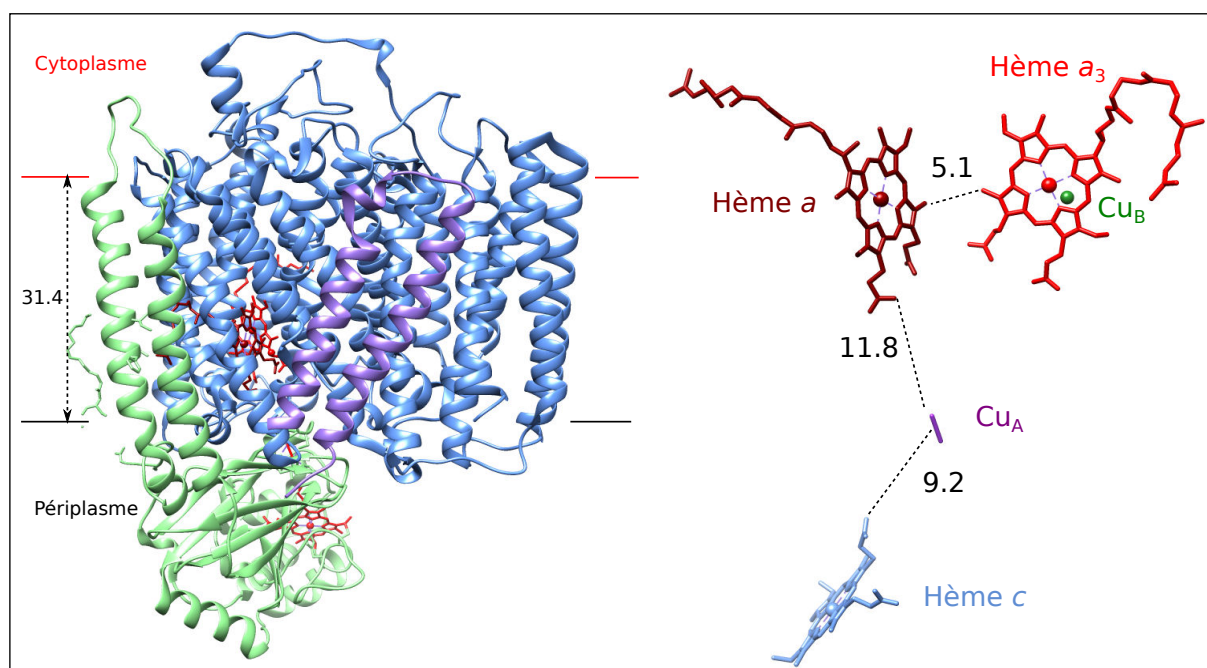


FIGURE I.22 – **Structure et organisation des cofacteur de la CcOx *caa*₃ de *Thermus thermophilus*.** **Gauche** : structure (modèle en ruban). SU I/III : bleu ; SU IIc : vert ; SU IV : violet. Les hèmes sont représentés en rouge. **Droite** : Organisation des cofacteurs au sein du complexe. La distance bord-à-bord des cofacteurs est donnée en Å. code PDB : 2YEV.

Les autres oxydases terminales de la chaîne respiratoire

Geobacillus stearothermophilus possède une chaîne respiratoire branchée, offrant différentes possibilités pour réoxyder les hydroquinones. Les différentes voies sont exprimées selon les conditions du milieu. Les oxydases terminales peuvent être séparées en deux groupes en se basant sur leur substrat :

1. Les quinols oxydases, qui se servent directement des électrons fournis par les quinones pour réduire l'oxygène en H₂O, et ainsi court-circuitent le cytochrome *b*₆*c*.
2. Les cytochromes *c* oxydases, qui nécessitent l'étape intermédiaire de réduction du cytochrome *c* par les complexes Rieske/*b*, et permettent ainsi d'obtenir un pompage de protons supplémentaire, et donc un meilleur ratio H⁺/e⁻. *Geobacillus stearothermophilus* possède deux CcOx : la *caa*₃ et la *bo*₃.

Gène	Sous-unité	Poids moléculaire	Cofacteurs Redox
<i>cbaA</i>	SU I	61 kDa	hèmes <i>b</i> et <i>o</i> ₃ , <i>Cu</i> _B
<i>cbaB</i>	SU II	19 kDa	<i>Cu</i> _A

TABLE I.3 – **Composition en sous-unités de la CcOx *bo*₃ de *Geobacillus stearothermophilus*.** Informations tirées de Nikaido *et al.* (2000). Le site actif peut parfois contenir un hème de type *a*₃, la notation CcOx *b(a/o)*₃ est plus exacte.

I.4 Objectifs

Ce travail de thèse marque le début de l'étude d'un super-complexe au sein du laboratoire. Les objectifs du projet, et donc de cette thèse, sont multiples. Tout d'abord, la mise au point d'un protocole de purification permettra d'isoler le super-complexe, pour pouvoir l'étudier par des techniques biophysiques. Le super-complexe isolé sera également utilisé pour étudier la régulation du transfert des électrons au sein d'un organisme utilisant des quinones à bas potentiel redox.

Les super-complexes, comment ?

Les membranes bioénergétiques sont très densément peuplées en protéines. Au sein des ces membranes, il semblerait que certains complexes protéiques diffusent librement alors que d'autres s'associent entre eux pour former des assemblages supra-moléculaires stables appelés super-complexes. Qu'est-ce qui permet l'association stable de complexes protéiques ? Quelle est la nature des interactions protéines:protéines et protéines:lipides à la surface du super-complexe ? Une structure d'un super-complexe à haute résolution permettrait de répondre à ces questions.

L'objectif à long terme de ce projet est l'utilisation de la cristallographie aux rayons X afin de déterminer la structure d'un super-complexe respiratoire à haute résolution. C'est un objectif ambitieux, aucune structure n'a pour l'instant été résolue à haute résolution.

La mise en place d'un protocole de purification du super-complexe $b_6c : caa_3$ de la chaîne respiratoire de *Geobacillus stearothermophilus* est le projet central de cette thèse. Ce super-complexe est un objet d'étude intéressant, susceptible d'être relativement stable, car provenant d'une bactérie thermophile. L'élaboration d'un tel protocole nécessite une caractérisation physico-chimique de l'échantillon. Celle-ci sera réalisée en utilisant les techniques de spectroscopie visibles et RPE, la spectrométrie de masse et la microscopie électronique.

Ménaquinone, oxygène et transfert d'électrons

Les chaînes respiratoires aérobies transfèrent les électrons du couple NADH/NAD^+ ($E_m = -320 \text{ mV}$) au couple $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($E_m = +800 \text{ mV}$). Cependant, si les couples donneurs et accepteurs d'électrons sont les mêmes, différents types de quinones peuvent être utilisées : les quinones haut potentiels ou bas potentiels.

La chaîne respiratoire mitochondriale est la mieux caractérisée. Elle utilise une quinone à haut potentiel : l'ubiquinone. A l'inverse, la chaîne respiratoire de *Geobacillus stearothermophilus* utilise une quinone à bas potentiel (la ménaquinone) comme cofacteur, afin de transférer les électrons au complexe cytochrome b_6c . Le changement de type de quinone, donc de potentiel redox du transporteur d'électron semble avoir un impact sur la chaîne, d'après l'arbre phylogénétique des quinones (cf. figure I.4). En effet, les quinones sont adaptées au potentiel redox dans lequel évolue l'organisme : la majorité des organismes possédant un métabolisme anaérobie fonctionnent avec des quinones à bas potentiels alors que la majorité des organismes vivant en aérobie utilisent des quinones à haut potentiels.

Chez certains organismes comme *Geobacillus stearothermophilus*, mais aussi *Corynebacterium glutamicum* (Niebis et Bott, 2003), l'utilisation de ménaquinone persiste après l'adaptation du métabolisme à un mode aérobie. Ces CTE, utilisant les mêmes donneurs et accepteurs d'électrons, fonctionnent donc avec un $\Delta E_m \sim 170$ mV au niveau du pool de quinone. Quelles sont les différences entre les CTE à MK et à UQ ? Peut-on appliquer à toutes les chaînes les principes développés au niveau des chaînes à haut potentiels ? De plus, la présence de ménaquinone dans des organismes aérobies soulève le problème de la réactivité de la quinone avec l'oxygène, en raison de son bas potentiel redox. Enfin, de façon accrue, la question de la réactivité de l'intermédiaire semiquinone, entraînant une possibilité de production de ROS au niveau du site Q_o des complexes Rieske/ b .

La question de l'hème c_i

Le cytochrome b_6c de *Geobacillus stearothermophilus* possède un cofacteur atypique, l'hème c_i , dans son site Q_i de réduction des quinones. Cet hème découvert en 2003 dans le cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii* a été caractérisé et étudié dans cet organisme, mais sa fonction reste encore inconnue. Cette étude n'a pas l'ambition d'élucider la fonction de l'hème c_i et le mécanisme réactionnel au niveau du site Q_i , étudié par différentes techniques depuis de nombreuses années, mais d'avancer sur sa caractérisation, dans une CTE respiratoire, à partir d'un organisme différent de *C. reinhardtii*.

II Matériel et Méthodes

II.1 Matériel	60
II.1.1 Souches bactériennes	60
II.1.2 Produits chimiques	60
II.1.3 Systèmes de purification et colonnes	61
II.1.4 Spectrophotomètres	61
II.2 Méthodes	62
II.2.1 Production et purification du super-complexe	62
II.2.2 Analyses biophysiques de l'échantillon	67

II.1 Matériel

II.1.1 Souches bactériennes

Les souches de *Geobacillus stearothermophilus* strain 10 et *Bacillus subtilis* w168 nous ont été fournies par le Dr. Ciaran Codon (FRE 3630 CNRS), la souche 20300 (ATCC 13032) de *Corynebacterium glutamicum* a été commandée chez DMSZ (collection du Leibniz Insitut). Toutes les cultures se font en milieu 2xYT (Sigma), à 55°C pour *G. stearothermophilus*, à 37°C pour *B. subtilis* et à 30°C pour *C. glutamicum*.

II.1.2 Produits chimiques

Les tampons de purification sont préparés à partir de TrizmaTM base Sigma Ultra, et de MOPS $\geq 99,5\%$ (titration), tout deux de chez Sigma. Les ligands utilisés lors des études par RPE sont synthétisés par Fabrice Giusti au sein du laboratoire : la TDS, à partir d'un protocole dérivé de Hofle *et al.* (1984) et le NQNO selon un protocole adapté de Wells (1952) et Cornforth et James (1956).

Tous les détergents utilisés lors de cette étude sont commandés chez Anatrace, sauf le SDS (Pierce) :

- β dodécyl-matoside (β -DDM), catégorie D310LA (faible teneur en forme α)
- FOS Choline 14 (FC₁₄), catégorie F3125 GM

- $C_{12}E_8$, ANAPOE catégorie APO 128
- SDS (pour les gels dénaturants), sequenal grade

II.1.3 Systèmes de purification et colonnes

Le système de purification HPLC Akta Purifier 10 (Pharmacia-GE Healthcare) est utilisé pour la chromatographie en phase liquide, contrôlé par le programme Unicorn (Amersham Pharmacia Biotech- GE Healthcare). Les colonnes sont décrites table II.1.

Colonnes	Volume	Préparation	Support	Groupe ment
Htq 1ml échangeuse d'anions	1 ml	GE Healthcare	Billes d'agarose et dextran 34 μ m	Ammonium quaternaire
Htq 5ml échangeuse d'anions	5 ml	GE Healthcare	Highly cross-linked agarose with dextran surface extender 34 μ m	Ammonium quaternaire
Qceramic échangeuse d'anions	20 ml et 100 ml	Préparée au laboratoire	Ceramic hyperD 50 μ m (Pall)	Ammonium quaternaire
MonoQ 10/100 GL échangeuse d'anions	7,8 ml	GE Healthcare	Polystyrene/divinyl benzene beads 10 μ m	Ammonium quaternaire
Superdex 200 10/300 GL	23,5 ml	GE Healthcare	Billes de dextran (taille moyenne : 13 μ m)	-
Aca 22	26 ml	Préparée au laboratoire	2% Acrylamide, 2% Agarose (taille moyenne : 60-140 μ m) (BioSeptra)	-
TSK G4000sw 60cm	21,1 ml	Tosoh Bioscience	Matrice en silice (taille moyenne : 8 μ m)	-

TABLE II.1 – **Colonnes utilisées pour la purification du super-complexe.** La colonne Tsk G4000sw contient une matrice en silice, et ne peut être utilisée à un pH supérieur à 7,5.

II.1.4 Spectrophotomètres

Les spectres visibles sont enregistrés sur un spectrophotomètre HP 8453 (Agilent, Hewlett Packard) ou un spectrophotomètre Cary 5E (spectres de titrations). Les spectres

RPE sont enregistrés sur un spectrophotomètre Bruker ElexSys/ESP300e X-band couplé à un cryostat à hélium (Oxford Instrument) et à un système de contrôle de température. Les spectres de photodissociation du CO sont mesurés sur un spectrophotomètre conçu au sein de l'UMR 7141 (cf. figure II.1).

FIGURE II.1 – **Représentation schématique du dispositif expérimental du spectrophotomètre "OPO"**. Le faisceau de détection est assuré par un laser OPO (MOPO 710, Spectra Physics) qui délivre des flashes lumineux sur la cuve contenant l'échantillon ainsi que sur la cuve de référence, avec une fréquence de 10 Hz. Le faisceau d'excitation est assuré par un laser à colorant Nd/YAG, dont la longueur d'onde peut être modifiée. L'excitation lumineuse est transmise à la cuve contenant l'échantillon par un ensemble de fibres optiques. Tiré de Beal *et al.* (1999).

Image copyright

II.2 Méthodes

II.2.1 Production et purification du super-complexe

L'objectif principal de cette thèse étant la production et l'isolation du super-complexe cytochrome b_6c : CcOx caa_3 de *G. stearothermophilus*, les protocoles de production et de purification ont beaucoup évolué durant ces 3 années. Notre approche a été de se baser sur la chromatographie échangeuse d'anion, puis le protocole a été construit en ajoutant différentes techniques, remodelé en changeant de place certaines étapes de purification. La mise en place du protocole est décrite dans les résultats. Les protocoles basiques utilisés pour chaque technique employée sont présentés dans cette section.

Conditions de culture

Deux protocoles ont été utilisés pour la croissance des cellules :

1. En erlenmeyers de 5 L en incubateurs. Même avec agitation, la concentration en oxygène du milieu reste faible. En effet, il est plus difficile de dissoudre de l'oxygène dans un liquide chaud, et les erlenmeyers utilisés (sans ailettes) ainsi que la vitesse d'agitation (140 rpm) ne permettent pas de compenser ce problème. Des erlenmeyers de 5 L contenant 1 L de milieu de culture sont inoculés en fin d'après-midi avec 1 ml de préculture dans le milieu chaud, puis placés dans un incubateur (Fermentas) à 55°C et 140 rpm d'agitation. Les cultures sont arrêtées le lendemain matin, à une densité optique (DO_{600nm}) $\sim 1,5$.

2. En fermenteurs de 2L Minifors (Infors) ou 30L (Marielle Bauzan, Unité de Fermentation, FR3479-CNRS-AMU-Marseille) avec contrôle de la pression d'oxygène (pO_2). Les fermenteurs possèdent plusieurs hélices pour l'agitation du milieu, ainsi qu'un système d'injection de gaz couplé à une électrode à oxygène permettant un contrôle de l'oxygénation du milieu de culture. Les fermenteurs sont inoculés avec 50 ml (fermenteur de 2L) de pré-culture. Les cellules croissent pendant 4 h à 55°C, avec une forte aération et forte agitation. La culture est arrêtée lorsque la pO_2 atteint 70 % ($DO \sim 7$).

A la fin de la culture les bactéries doivent immédiatement être placées à 4°C et centrifugées 15 min à 7 326 g, ou un phénomène de lyse cellulaire intervient rapidement. Les culots sont resuspendus dans du tampon de lyse (50 mM $NaPO_4$; 10 mM NaCl; 5 mM $MgSO_4$; 5 % Saccharose) puis placés à -20°C.

Préparation des membranes

Le mode de cassage des cellules a évolué au cours de cette thèse, avec l'arrivée de nouveaux équipements au laboratoire. Après décongélation des culots resuspendus dans du tampon de lyse, les cellules ont été cassées :

- soit par 2 passages à la presse de French à 1,5 MPa
- soit par 2 passages au broyeur cellulaire (CellD) à 2,400 Bar.

L'inhibiteur de protéase PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonyl) est ajouté en deux fois pour limiter la protéolyse, une première fois après décongélation et une seconde fois juste après le premier cycle de cassage, à une concentration finale de 1 mM. Les cellules cassées sont ensuite centrifugées à basse vitesse 20 min à 4 020 g pour éliminer les cellules non lysées et les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré à l'aide d'une pipette puis centrifugé (rotor Type 45 Ti) à 125 171 g pendant 1h afin de séparer la fraction membranaire de la fraction soluble. Les membranes sont resuspendues dans 40 mM Tris HCl pH 8, si la purification est effectuée à pH 8, ou dans 40 mM MOPS pH 7, si la purification est à pH 7 (cf. II.2.1 et III.2.3). La concentration des membranes est estimée en utilisant la méthode BCA, puis normalisée à 25 mg/ml. Les membranes sont alors aliquotées et placées à -80°C.

Solubilisation des membranes

Les membranes sont décongelées puis diluées dans de l'eau pour atteindre une concentration finale de 12,5 mg/ml. La solubilisation est effectuée à température ambiante sous agitation pendant 45 minutes avec du β -Dodécylmaltoside (β -DDM) à 15 mM (ratio de

masse protéine:détergent 1,6:1) ou avec de la FOS choline 14 (FC₁₄) à 10 mM (ratio protéine:détergent 3,3:1). Les concentrations de détergent utilisées ont été déterminées en effectuant des gammes de concentration : 100 μ l de membranes à 25 mg/ml sont solubilisées dans 100 μ l de tampon contenant 20 mM de Tris HCl pH 8 et différentes concentration de β -DDM ou de FC₁₄ : 0 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM.

Une centrifugation à 80 000 rpm (rotor TLA 110) pendant 10 min ou 40 000 rpm pendant 45 min (rotor Type 45 Ti), suivant le volume de l'échantillon, permet la séparation entre les protéines solubilisées et les membranes.

Ultracentrifugation sur gradient de saccharose

Les membranes ainsi que les fractions enrichies en super-complexe peuvent être séparées selon leur densité et leur taille à l'aide d'une étape d'ultracentrifugation sur gradient de saccharose. Les échantillons sont déposés délicatement sur un gradient linéaire 10%-30% contenant, selon le protocole utilisé :

- 20 mM de Tris HCl pH 8 ou 20mM de MOPS NaOH pH 7
- 0,4 mM de β -DDM, de FC₁₄ ou de C₁₂E₈

Le gradient est coulé en utilisant un mélangeur et une pompe péristaltique. Selon le protocole de purification et le volume des échantillons, différents rotors ont été utilisés :

Le rotor MLS-50 est un rotor à godets oscillants, dont les tubes ont une contenance d'environ 5 ml. Il a été utilisé pour l'analyse et la mise au point du protocole : 200 μ l de membranes solubilisées sont déposées sur un gradient linéaire de 4 ml, puis centrifugées 4 h à 163 464 g (50 000 rpm).

Le rotor SW 41 est lui aussi un rotor à godets oscillants, utilisé pour la purification du super-complexe. Entre 1 et 2 ml de membranes solubilisées sont déposées sur un gradient linéaire de 10 ml, puis centrifugés 16 h à 151 263 g (35000 rpm).

Le rotor 45 Ti est un rotor à angle fixe dont les tubes ont une contenance d'environ 60 ml. Il ne permet pas d'obtenir une aussi bonne résolution que les rotors utilisés précédemment, mais permet d'augmenter le rendement de purification. En effet, 6 ml de membranes solubilisées ou de fractions de purification peuvent être déposées sur un gradient linéaire de 50 ml, puis centrifugées 16 h à 22 000 rpm.

Le super-complexe contenant des hèmes, il est facile de le visualiser par une bande brune/rouge. Dans le cas d'une purification, cette bande peut alors être prélevée délicatement avec une seringue. Pour une analyse plus précise de la migration des protéines au sein du gradient, le gradient peut être fractionné en utilisant une pompe péristaltique, ou en prélevant délicatement des fractions depuis le haut avec une pipette.

Chromatographie échangeuse d'anions

Différentes colonnes échangeuses d'ions ont été utilisées pour purifier le super-complexe (cf. table II.1), mais le protocole reste similaire. La colonne est préalablement équilibrée en tampon A (cf. table II.3). Après injection de l'échantillon et lavage de la colonne en tampon A, les protéines sont éluées par un gradient linéaire de tampon B de 0 à 1 M de NaCl. L'absorbance est suivie à 280 nm et 420 nm, longueur d'onde d'absorption des hèmes.

Pour certaines purifications, un échange de détergent est effectué sur colonne échangeuse d'anions. Dans ce cas, la colonne est équilibrée avec le tampon A contenant le premier détergent, puis l'échantillon est injecté et lavé pendant 2 volumes de colonne (CV). Le tampon est alors remplacé par un tampon contenant le nouveau détergent, et l'échantillon est lavé pendant 5 CV. L'élution se fait aussi avec le nouveau détergent. Par exemple, pour un échange entre la FC₁₄ et le β -DDM, la colonne est équilibrée en tampon A_{1,F}, puis après l'injection et le passage de 2 CV supplémentaire de ce tampon, le tampon A_{1,D} est utilisé. L'élution se fait avec le tampon B_{1,D}.

Chromatographie d'exclusion de taille (SEC)

La chromatographie d'exclusion de taille permet de séparer les protéines en fonction de leur rayon hydrodynamique ou rayon de Stockes (R_S). En fonction du R_S de la protéine étudiée, différentes colonnes peuvent être utilisées. Le super-complexe étant un assemblage supra-moléculaire de complexes de poids moléculaires conséquent (76 kDa pour un monomère de cytochrome *b₆c*, 150 kDa pour un monomère de CcOx *caa₃*), il convient de sélectionner une colonne permettant la séparation de molécule avec un R_S élevé. Différentes colonnes ont été utilisées durant cette étude (cf. II.1), en suivant le même protocole. La colonne est équilibrée avec 3 CV de tampon C (cf. II.3), puis la protéine est injectée et élue en tampon C.

La colonne TSK G4000sw, utilisée pour estimer le poids moléculaire du super-complexe, est calibrée avec les marqueurs présentés table II.2. La courbe de calibration de la colonne est calculée en utilisant le K_D , permettant de comparer différentes calibrations d'une même colonne en s'affranchissant des changements de volume liés à l'expérience.

$$K_D = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Où V_e , V_o et V_t sont respectivement le volume d'élution, le volume mort et le volume total.

Marqueur (organisme)	Poids moléculaire	Code catalogue	R_S (nm)
Bleu dextran	V_0		
Tyroglobuline (Bovine)	670 kDa	T1001	8,6
Apo-ferritine (Horse)	440 kDa	A3641	6,3
Catalase (Bovine liver)	250 kDa	C1345	5,2
Myoglobine (Horse)	17 kDa	M-0630	1,9
Acétone	V_t		

TABLE II.2 – Marqueurs de poids moléculaire utilisés pour calibrer la colonne TSK G4000sw. Tous les marqueurs proviennent de chez Sigma-Aldrich. R_S : rayon de Stockes.

Tampon	Composition
$A_{1,D}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM β -DDM
$A_{1,F}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM FC_{14}
$A_{1,C}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM $C_{12}E_8$
$A_{2,D}$	20 mM MOPS pH 7, 0.4 mM β -DDM
$A_{2,D-}$	20 mM MOPS pH 7, 0.2 mM β -DDM
$B_{1,D}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM β -DDM, 1 M NaCl
$B_{1,F}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM FC_{14} , 1 M NaCl
$B_{1,C}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM $C_{12}E_8$, 1 M NaCl
$B_{2,D}$	20 mM MOPS pH 7, 0.4 mM β -DDM, 1 M NaCl
$B_{2,D-}$	20 mM MOPS pH 7, 0.2 mM β -DDM, 1 M NaCl
$C_{1,D}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM β -DDM, 150 mM NaCl
$C_{1,F}$	20 mM Tris HCl pH 8, 0.4 mM FC_{14} , 150 mM NaCl
$C_{2,D}$	20 mM MOPS pH 7, 0.4 mM β -DDM, 150 mM NaCl
$C_{2,D-}$	20 mM MOPS pH 7, 0.2 mM β -DDM, 150 mM NaCl

TABLE II.3 – Tampons de purification utilisés lors des différentes étapes de chromatographie.

Analyse biochimique par électrophorèse sur gel d'acrylamide

L'analyse du contenu protéique des échantillons est effectuée par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ou en conditions natives (CN-PAGE).

SDS-PAGE : Les échantillons sont mis en solution dans 5 mM DDT, 5 mM Na_2CO_3 , 2% SDS, 30% saccharose, puis déposés sur gel d'acrylamide 12% épais (1,5 mm). La migration se fait à 20 mA pendant environ 1 h. La révélation spécifique des hèmes liés covalamment aux protéines (hèmes *c*) se fait par la détection de leur activité peroxydase, à l'aide du 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMBZ), qui se colore en bleu lorsqu'il est oxydé (Thomas *et al.*, 1976). Le gel est incubé 20 min à l'obscurité dans une solution contenant 0,25 M d'acétate de sodium pH 5 et 3,6 mM de TMBZ préalablement solubilisé à l'obscurité dans 30 ml de méthanol. La coloration se développe en 5 à 10 minutes après ajout de H_2O_2 . Dans un second temps le gel peut être coloré à l'argent ou au bleu de Coomassie.

CN-PAGE : Une solution de saccharose est ajoutée à l'échantillon à une concentration finale de 5% pour le densifier. L'échantillon est chargé sur un gel contenant un gradient d'acrylamide de 5% à 12%. Le gel migre pendant environ 2 h à 10 mA, entre un tampon "cathode" (50 mM Tricine, 15 mM Bis-tris, 0,02% (w/v) β -DDM et 0,05 % (w/v) déoxycholate) et un tampon "anode" (50 mM Bis-tris/HCl pH 7). Le gel peut être coloré au bleu de Coomassie ou au nitrate d'argent.

Analyse biochimique par spectrométrie de masse

Super-complexe en solution : Le super-complexe purifié est précipité à l'acétone, puis réduit au DTT pour éliminer les ponts disulfures. Une étape d'alkylation des cystéines permet d'empêcher la reformation de ces liaisons. L'échantillon est alors digéré à la trypsine sur la nuit, puis concentré par une étape de speed vacuum. Les peptides sont resuspendus dans le tampon d'analyse (acétonitrile et acide formique). Le contenu en peptides est analysé par spectrométrie de masse orbitrap par Chiara Guerrero, à la plate-forme protéomique de l'hôpital Necker.

Analyse de bandes de gels : Après migration de l'échantillon sur un gel SDS (fin, pour limiter la quantité d'acrylamide), les bandes sont découpées, lavées, réduites et soumises à une étape d'alkylation. La digestion à la trypsine a lieu directement dans le gel. Les peptides sont extraits du gel par de l'acétonitrile, qui sera évaporé par speed vacuum. L'échantillon est repris dans le tampon d'analyse contenant de l'acétonitrile et du TFA (acide trifluoro-acétique), et analysé par Sandrine Masscheleyn sur un Spectromètre MALDI-TOF.

II.2.2 Analyses biophysiques de l'échantillon

Spectroscopie visible

La spectroscopie visible est très utilisée pour l'étude des complexes des chaînes respiratoires. Les cofacteurs redox du super-complexe, et notamment les hèmes bas spins, absorbent dans le

domaine du visible. La plupart des hèmes réduits sont sous forme Fe^{2+} , et possèdent trois pics d'absorption dans le visible : α , β , et γ (cf. figure II.2). Le pic γ , présent autour de 410 nm est aussi appelé bande de Soret, c'est le signal le plus important. A de plus grandes longueurs d'ondes, de plus faibles signaux sont observés, notamment ceux de la bande α , visibles lorsque les hèmes sont à l'état réduit. Les pics de la bande α permettent d'identifier facilement le(s) type(s) d'hèmes présents dans l'échantillon, et de calculer leurs concentrations. En couplant le système à un système de réglage du potentiel redox, l'évolution des signaux des hèmes peut être utilisé pour déterminer les potentiels redox à l'équilibre des hèmes au sein des protéines.

Image copyright

FIGURE II.2 – **Spectre visible de l'hème c** du cyt c_{554} de *Methylosinus trichosporium* (Harbitz et Andersson, 2011). Courbe noire : état oxydé ; courbe rouge : état réduit au dithionite. Les trois bandes d'absorption caractéristiques des hèmes c sont visibles sur ce spectre.

Spectres et détermination de concentration

La concentration en hèmes de l'échantillon est calculée à partir des différences de spectres en se basant sur l'amplitude de la bande α des hèmes a , b ou c . Des spectres des échantillons sont enregistrés sur un spectrophotomètre Cary 5E, dans différents états redox : oxydé (à l'air, état "normal" de l'échantillon), réduit à l'ascorbate, un réducteur faible qui réduit les cofacteurs qui possèdent un potentiel redox élevé, tels que les hèmes a ou c , et réduit au dithionite, un réducteur puissant qui réduit la totalité des groupes redox du super-complexe. La concentration en hèmes a ou c est déterminée à partir de la différence "ascorbate-oxydé", et celle des hèmes b à partir de la différence "dithionite-ascorbate", en appliquant la loi de Beer Lambert :

$$\Delta A_i = \varepsilon_i l c_i$$

(A : absorbance ; c : concentration ; l : trajet optique ; ε : coefficient d'extinction molaire, cf. table II.4).

Coefficients d'extinction molaire	
ε_a	$11.6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
ε_b	$20 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
ε_c	$21.2 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

TABLE II.4 – **Estimation des coefficients d'extinction molaire des hèmes utilisés.** ε_a : Sone et Yanagita (1982), ε_b : Pierre *et al.* (1997) , ε_c est une estimation à partir de deux ε_c différents : pour l'hème *c* du cyt *c*₅₅₀ Wachenfeldt et Hederstedt (1990) et celui de la sous-unité II de la CcOx *caa*₃ Sone et Yanagita (1982).

Titration électrochimique

La titration redox des hèmes du super-complexe peut être effectuée par l'intermédiaire d'une cellule électrochimique contenant une grille d'or et 3 électrodes (cf. figure II.3), reliée à un potentiostat. Le potentiostat permet d'imposer un potentiel, et l'ajustement au sein de la cellule se fait par un échange d'électrons avec l'échantillon par le biais de la grille d'or. Cette cellule est remplie avec 50 μl d'échantillon concentré (50 μM) et 20 μM de chaque médiateur (cf. table II.5). En effet, il est nécessaire d'ajouter de faibles concentrations (entre 10^{-6} et 10^{-4} M) de médiateurs redox pour rejoindre plus rapidement l'état d'équilibre entre les centres redox titrés et l'électrode. Comme un médiateur ne fonctionne efficacement que dans la zone de son potentiel redox, une série de médiateurs est nécessaire afin de couvrir toute la zone du super-complexe et ainsi réaliser la titration. De nombreux médiateurs pouvant s'oxyder à l'air, la réaction doit dans la mesure du possible être maintenue en anaérobie. On peut également rajouter quelques grains de l'enzyme glucose oxydase et son substrat le glucose (20 mM), pour consommer l'oxygène présent dans le milieu et accélérer l'équilibration.

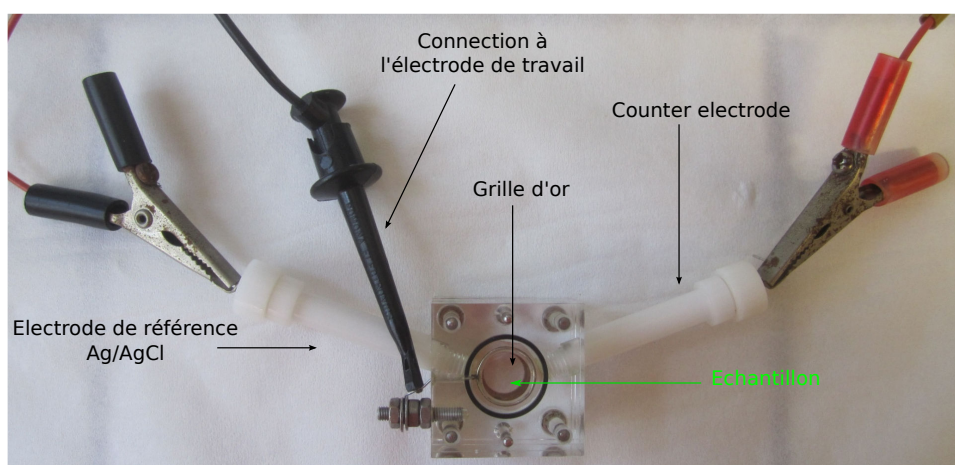


FIGURE II.3 – **La cellule électrochimique.** La réaction de transfert d'électrons se déroule au niveau de la grille d'or ("l'électrode de travail"). L'électrode de référence Ag/AgCl 3 M KCl a un potentiel constant, alors que la "counter électrode" permet le passage du courant depuis l'électrode de travail sans passer par l'électrode de référence Baymann *et al.* (1991).

Médiateur	Potentiel redox
1,1-Ferrocene-di-carbozonic acid	+ 644 mV
Mono Ferrocene	+ 530 mV
Ferrocene	+ 422 mV
<i>p</i> -benzoquinone	+ 280 mV
2,5-(CH ₃) ₂ - <i>p</i> -benzoquinone	+ 180 mV
1,2-naphtoquinone	+ 145 mV
1,4-naphtoquinone	+ 60 mV
2-(CH ₃)-1,4-naphtoquinone	0 mV
2,5-di-OH- <i>p</i> -benzoquinone	- 60 mV
Antraquinone-2,6-disulfonate	- 184 mV
Antaquinone-2-sulfonate	- 225 mV
benzylviologen	- 350 mV / - 540 mV

TABLE II.5 – Médiateurs utilisés pour la titration électrochimique par spectroscopie visible. Les potentiels sont donnés par rapport à l'électrode standard à hydrogène (SHE).

La cellule, d'un trajet optique de 100 μm , est reliée à un potentiomètre qui permet d'ajuster le potentiel redox de la solution, puis placée dans l'axe du faisceau du spectrophotomètre (Cary 5E). Un premier spectre est pris à un potentiel de départ (à un potentiel bas dans le cas d'une oxydation, ou un potentiel élevé dans le cas d'une titration réductrice), qui servira de référence à laquelle on soustraira les spectres suivants. Le potentiel est ensuite changé en effectuant des pas de 30 mV (vers des valeurs plus positives pour l'oxydation ou plus négatives pour la réduction), puis un spectre est enregistré après équilibration (le temps d'équilibration varie entre 5 et 25 minutes selon les potentiels redox). Lorsque l'échantillon est totalement réduit ou totalement oxydé, on décale le potentiel de 15 mV et on recommence le titrage dans l'autre sens. A la fin de l'expérience, on obtient donc un point tous les 15 mV.

Pour l'analyse des données, le premier spectre est soustrait à tous les autres spectres enregistrés pour obtenir des spectres de différence. Puis les amplitudes des pics correspondant aux différents hèmes, dans les bandes α et dans la bande de Soret sont extraites par des différences d'absorbance entre deux longueurs d'onde. Un graphe de ces différences d'absorbance en fonction du potentiel redox appliqué est ensuite tracé. Une courbe de Nernst peut être ajustée à cette famille de points, permettant d'extraire le potentiel redox à l'équilibre.

$$E_m = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}}$$

E_m : potentiel redox moyen (à l'équilibre) ; E^0 : potentiel redox standard ; n : nombre d'électrons transférés (toujours 1 dans nos analyses) ; F : constante de Faraday ; R : constante des gaz parfaits ; T : température en K.

Les potentiels redox déterminés peuvent ensuite être utilisés pour déconvoluer les spectres et obtenir les spectres individuels des cofacteurs à leurs potentiels redox à l'équilibre. Pour cela, le programme *mEh-fit* (algorithme de Levenberg-Marquardt et algorithme "general least-square") (Baymann *et al.*, 1991) ou un programme développé au laboratoire par Daniel Picot ont été utilisés.

Spectroscopie RPE

La résonance paramagnétique électronique (RPE), aussi appelée résonance de spin électronique (RSE) est une technique analogue à la RMN, qui étudie les spins électroniques alors que la RMN étudie les spins nucléaires. Elle permet d'obtenir des informations concernant la nature des espèces magnétiques présentes dans l'échantillon, en se basant sur la propriété de certains électrons à absorber puis réémettre l'énergie d'un rayonnement électromagnétique lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique.

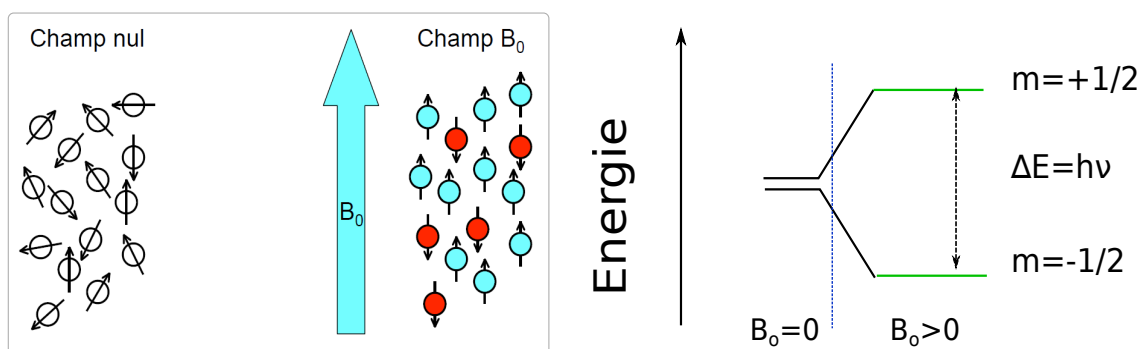


FIGURE II.4 – Orientation des espèces paramagnétiques dans un champ magnétique

Cette technique d'analyse ne concerne que les espèces paramagnétiques, radicaux organiques et métaux de transition (CuII, NiIII, FeII/III, MnII, MoV), comme les hèmes ou les centres Fer-Soufre que l'on retrouve dans les chaînes de transfert d'électrons et qui contiennent des électrons non appariés. Lorsque ces espèces sont placées dans un champ magnétique, leur moment magnétique va s'aligner sur l'axe du champ (B_0 dans la figure II.4) selon 2 orientations possibles, ce qui entraîne la présence de 2 populations avec 2 niveaux d'énergie : une de basse énergie alignée au champ et une de plus haute énergie opposée au champ. Ces deux populations correspondent au split de Zeeman, et leur niveau d'énergie correspond à :

$$E_{+1/2} = \frac{1}{2}g\mu B$$

$$E_{-1/2} = -\frac{1}{2}g\mu B$$

Avec μ : le moment magnétique ; B : le champ magnétique ; le terme $g\mu$ est le ratio gyromagnétique. En dehors du champ magnétique, $E_{+1/2} = E_{-1/2}$. On peut alors écrire :

$$\Delta E = h\nu = g\mu B$$

Les deux populations se répartissent selon une distribution de Boltzman, qui peut être décrite par l'équation :

$$\frac{N_{upper}}{N_{lower}} = e^{\frac{-\Delta E}{k_B T}} = e^{\frac{-g\mu_B}{k_B T}}$$

Avec k_B la constante de Boltzman et T la température en K. Quand x est très petit, on peut approximer $e^x \sim 1 - x$, d'où

$$\frac{N_{upper}}{N_{lower}} = 1 - \frac{-g\mu_B}{k_B T}$$

Des transitions peuvent être induites entre ces deux niveaux énergétiques, le but de la résonance paramagnétique électronique (RPE) est précisément d'étudier ces transitions.

A 298 K dans un champ d'environ 3 000 G, la distribution entre les deux niveaux d'énergie présente un ratio $N_{upper}/N_{lower} = 0,9986$, traduisant une différence de population très faible entre les deux populations. La légère supériorité de la population à bas niveau d'énergie entraîne l'apparition d'un signal lorsque l'échantillon rencontre une onde électromagnétique d'une énergie correspondante à une transition. L'enregistrement d'un signal différentiel permet d'éliminer des variations de l'énergie de la source de micro-ondes.

Pour augmenter la sensibilité du signal, il faut déséquilibrer davantage la différence de peuplement des deux états énergétiques.

$$N_{upper} - N_{lower} = N_{lower} \left[1 - \left(\frac{1-g\mu_B}{k_B T} \right) \right] = \frac{Ng\mu_B}{2k_B T}$$

La sensibilité est donc augmentée lorsque la température diminue, et le champ magnétique augmente. Les spectres RPE ont été enregistrés lors de notre étude à des températures entre 5 K et 15 K, et à des valeurs de champ magnétique entre 5 et 500 mT.

La RPE est une technique de choix pour étudier de nombreux cofacteurs des chaînes de transfert d'électrons, car il existe en général un nombre limité d'espèces paramagnétiques dans les échantillons étudiés. De plus, les signaux RPE sont très sensibles à l'environnement, il est ainsi possible d'étudier des phénomènes (comme la réorganisation d'un site actif suite à la liaison d'un ligand) qui sont difficilement observables par d'autres techniques.

Enregistrement de spectres RPE

Différents échantillons sont étudiés en RPE, afin de répondre à différentes questions qui ont pu se poser durant cette étude :

- Des membranes, solubilisées ou non solubilisées
- Des échantillons à différents stades de purification et résultant de différents protocoles

250 μ l d'échantillon sont placés dans un tube RPE et congelés dans l'azote liquide. Pour les échantillons purifiés en tampon Tris, un tampon MOPS à pH 7 à 100 mM est ajouté à la solution. En effet, le pH du Tris varie en fonction de la température, et les spectres RPE sont enregistrés autour de 5 K à 15 K, il est donc préférable d'utiliser un tampon dont le pH est

moins sensible aux variations de température.

Titration redox par RPE

Les quantités de super-complexe requises pour un titrage RPE (7 ml de supercomplexe à $\sim 10 \mu M$) nécessitent de modifier le protocole de purification. Les membranes solubilisées en FC₁₄ sont chargées sur un gradient de saccharose de 50 ml (rotor 45 Ti), puis centrifugées 15 h à 22 000 rpm. L'échantillon est alors injecté sur une colonne de Q ceramic (20 ml) en tampon A_{1,F}, puis élué en 5 CV de tampon B_{1,F}. Après 1 h de dialyse contre 20 mM de tampon Tris pH 8, l'échantillon est purifié sur colonne htq 5ml avec les mêmes tampons A_{1,F} et B_{1,F}. Le pic de super-complexe, élué à 200 mM de NaCl est concentré avec un centricon de 15 ml, avec un seuil de passage de 100 kDa, puis congelé à -80 °C. L'échantillon utilisé pour la titration RPE n'est pas passé au préalable sur un tamis moléculaire, les contaminants restant à cette étape de purification n'ont pas de signal RPE donc ne participent pas aux spectres du super-complexe.

Dans une cellule sous argon reliée à un potentiostat, on place 7 ml de supercomplexe à $\sim 10 \mu M$ dans 100 mM de tampon MOPS pH 7, et un barreau magnétique pour l'agitation. Pour ce titrage également l'ajout de médiateurs (cf. table II.6) permet d'atteindre l'équilibre plus rapidement. Cependant, l'absence de grille d'or pour assurer la stabilité (comme dans le cas de la cellule électrochimique), requière l'ajout de médiateurs à une concentration plus élevée : 100 μM . L'échantillon est réduit à l'aide d'ascorbate et de dithionite, et oxydé avec du ferricyanure ou de l'oxygène. Des échantillons d'environ 200 μl sont prélevés à différents potentiels redox, puis congelés et leur spectre PRE est enregistré.

Les données sont analysées de la même manière que pour la spectroscopie visible : le spectre de référence est soustrait des spectres suivants, et l'amplitude de chaque pic est tracé en fonction du potentiel redox de l'échantillon. La courbe est ajustée avec une équation de Nernst pour extraire la valeur du potentiel redox à l'équilibre.

Photodissociation du CO

L'échantillon de super-complexe purifié ou de cellules entière est placé dans une cuve de verre de 4 ml, de trajet optique 1 cm. L'échantillon est réduit avec 5 mM d'ascorbate, puis la cuve est fermée à l'aide d'un septum en caoutchouc, et reliée à une rampe à gaz par l'intermédiaire d'une aiguille traversant le septum. Deux cycles de mise sous vide et d'injection de CO gazeux permettent de mettre l'échantillon sous une atmosphère de CO. La cuve est ensuite placée dans l'axe du spectrophotomètre. Un spectre de référence du complexe réduit est enregistré. Puis le CO est dissocié par un flash laser et des spectres de photodissociation sont enregistrés à différentes longueurs d'ondes après 100 μs .

Médiateur	Potentiel redox
Mono Ferrocene	+ 530 mV
N,N,N',N'-Tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine	+ 270 mV
2,6-dichlorophenol-indophenol	+ 217 mV
1,2-naphtoquinone <i>p</i> -benzoquinone	+ 145 mV
Cresyl blue	+ 47 mV
Methylene blue	+ 11 mV
2,5-di-OH- <i>p</i> -benzoquinone	- 60 mV
Indigocarmin	- 125 mV
Antraquinone-2,6-disulfonate	- 184 mV
Antaquinone-2-sulfonate	- 225 mV
Safranine T	- 280 mV
Neutralred	- 325 mV

TABLE II.6 – **Médiateurs utilisés pour la titration chimique par spectroscopie RPE.** Les potentiels sont donnés par rapport à l'électrode standard à hydrogène (SHE).

III Résultats

III.1 Production du super-complexe	78
III.2 Purification	81
III.2.1 Solubilisation et test de détergents	81
III.2.2 <i>G. stearothermophilus</i> possède-t-il un super-complexe ?	86
III.2.3 Mise en place d'un protocole de purification	90
III.2.4 Vers la cristallographie	108
III.3 Caractérisation du super-complexe purifié	109
III.3.1 Composition en sous-unités du super-complexe	109
III.3.2 Polydispersité de l'échantillon	112
III.3.3 Spectroscopie visible	116
III.3.4 Étude du super-complexe par spectroscopie RPE	118
III.3.5 Fixation du CO sur le super-complexe	130
III.4 Titration redox des cofacteurs	137

La formation de super-complexes dans les chaînes de transfert d'électrons (CTE) a été mise en évidence biochimiquement dans un grand nombre d'organismes. Cela a pour conséquence que l'étude des complexes isolés de ces CTE nécessite au préalable de casser l'organisation supra-moléculaire, le plus souvent par l'intermédiaire de détergents déstabilisants, pouvant également rendre délicates les études structurales. En revanche, il est permis d'espérer que les super-complexes soient suffisamment structurés pour pouvoir les étudier biochimiquement et structuralement. Le travail décrit ici va tout d'abord devoir déterminer le super-complexe à étudier en solubilisant les composants de la chaîne respiratoire avec des conditions plus ou moins dissociantes (principalement en jouant sur le type et la concentration de détergent) afin de trouver celles qui permettent d'isoler un super-complexe stable.

Cette première étape établie, il convient de mettre en place un protocole de purification de ces super-complexes au moyen des outils disponibles pour la biochimie des protéines membranaires, en utilisant comme critère l'obtention d'un super-complexe capable de former des cristaux aptes à déterminer une structure tridimensionnelle à haute résolution.

Un tel processus n'est pas une route droite, mais un long chemin tortueux. En effet, la démarche doit être répétée par approximations successives en reprenant à nouveau les différentes étapes :

1. Détermination de conditions optimales de croissance de la bactérie pour exprimer le super-complexe sélectionné.
2. Détermination des conditions de solubilisation.
3. Optimisation ou mise en place d'étapes supplémentaires de purification.
4. Redéfinition et caractérisation du super-complexe.
5. Tests de stabilité.
6. Tests de cristallisation.

Une expression hétérologue n'était pas possible pour cette étude, car il est nécessaire de conserver les conditions physiologiques de formation du complexe (comme la composition en lipides), ainsi que la machinerie d'insertion des différents cofacteurs. Il nous restait comme possibilité soit d'ajouter une étiquette dans la souche sauvage, soit d'effectuer une biochimie classique sans biologie moléculaire. C'est cette deuxième voie qui sera présentée ici. L'autre approche est développée en parallèle dans le laboratoire, mais elle n'a pas encore abouti.

Dans ces différentes étapes, nous avons été aidés par des études biochimiques antérieures qui ont montré l'existence de super-complexes apparemment stables d'un point de vue biochimique dans des organismes proches du nôtre (Berry et Trumpower, 1985; Sone *et al.*, 1987; Niebisch et Bott, 2003), en mettant en évidence une interaction entre le complexe Rieske/*b* et la cytochrome *c* oxydase (CcOx). Chez *Geobacillus stearothermophilus*, ces deux complexes possèdent chacun un ou deux cytochromes de type *c* (c'est à dire liés covalamment), ce qui permet de tester rapidement si les complexes sont dissociés ou non, par une simple coloration au TMBZ sur gel SDS-PAGE, pour détecter les hèmes. Cette propriété, qui n'est pas présente dans la plupart des autres super-complexes homologues, sera utilisée abondamment dans ce travail.

Une des difficultés dans ces études sur les super-complexes est d'appréhender correctement leur polydispersité. Ceci peut être illustré notamment par des clichés de microscopie électronique, qui montrent l'existence d'une hétérogénéité de notre échantillon, expliquant probablement pourquoi nous n'avons pas encore obtenu de cristaux. L'optimisation du protocole de purification est toujours en cours.

Les nombreux cofacteurs du super-complexe facilitent sa caractérisation. La RPE permet, par exemple, de mettre en évidence le groupe [2Fe-2S] de la protéine de Rieske, qui se dissocie facilement du complexe. Cette technique permet également de mettre en évidence l'atome de fer haut-spin de l'hème *c_i* du complexe cytochrome *b₆c*, qui est difficilement détectable en spectroscopie optique.

La spectroscopie optique fournit un outil de caractérisation facile à mettre en œuvre, mais la superposition des signaux d'au moins huit hèmes rend la déconvolution peu aisée. Pour pallier ce problème, nous avons entrepris une titration complète de presque tous les cofacteurs du super-complexe. En plus d'une aide précieuse pour notre biochimie, ces expériences nous ont permis de

déterminer les potentiels redox de ces cofacteurs et de les replacer au sein d'une chaîne respiratoire. Ces résultats, qui contredisent des résultats partiels antérieurs, sont en revanche en plein accord avec le modèle du Q-cycle décrit en 1976 par Peter Mitchell, entraînant des conséquences pour le reste des chaînes de transfert d'électrons (cf. IV).

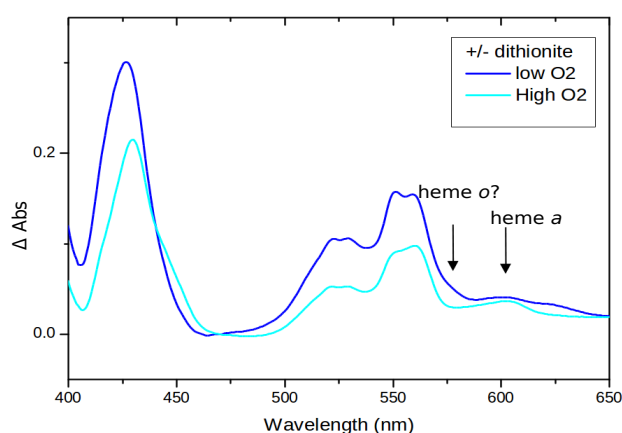
Les différentes étapes de ce travail sont décrites plus en détails dans ce chapitre.

III.1 Production du super-complexe

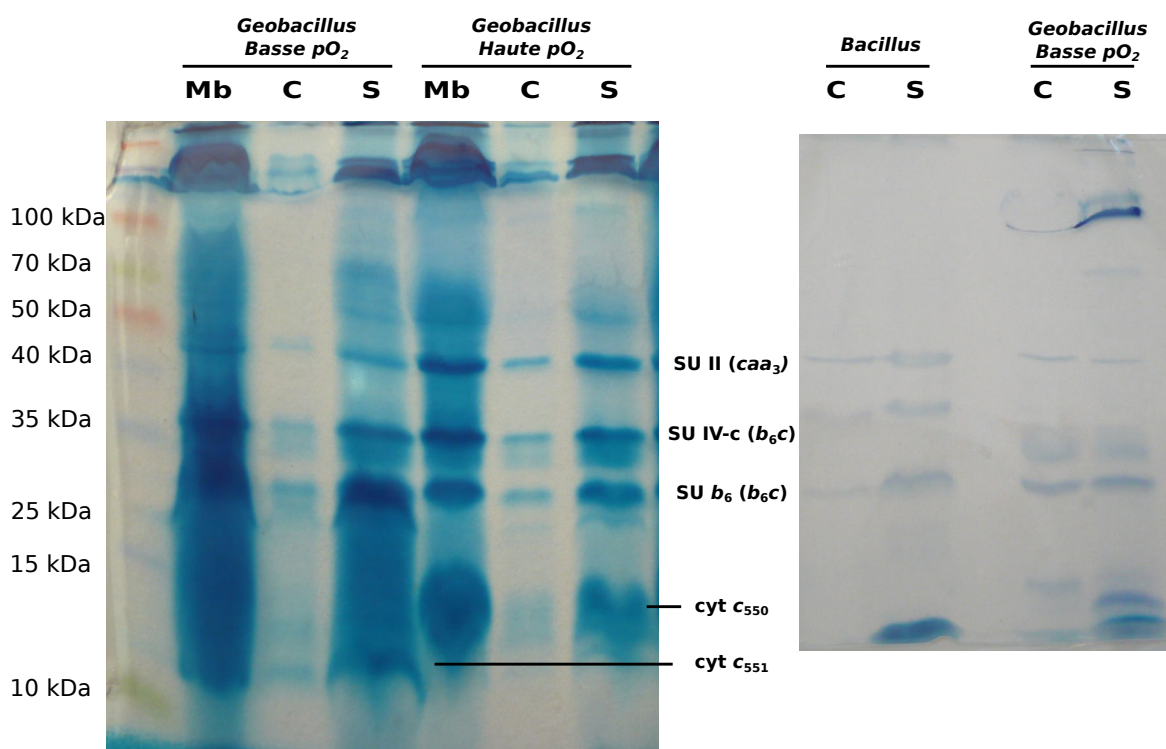
Les conditions de croissance ont évolué au cours de cette thèse, et sont étroitement liées à la production du super-complexe. La souche *Geobacillus stearothermophilus* strain 10 croît à une température d'environ 55°C. À cette température, l'oxygène se dissout moins bien dans l'eau, donc il est plus compliqué de maintenir une pression d'oxygène élevée. L'oxygénation du milieu de croissance de *G. stearothermophilus* est une variable importante qui influence l'expression des oxydases terminales. Le super-complexe contenant la CcOx *caa3*, il convient de déterminer les conditions optimales d'expression de ce complexe.

Pour cela, différentes méthodes peuvent être utilisées pour observer le contenu en protéines des membranes. Dans cette étude, les bactéries ont été cultivées soit en fermenteurs avec une oxygénation contrôlée, soit en erlenmeyer (cf. II.2.1). L'analyse de l'expression des composants du super-complexe dans ces deux conditions de culture a été effectuée par gel SDS-PAGE et spectroscopie visible, et révèle une différence d'expression de la CcOx *caa3*.

- La figure III.1b montre un gel SDS-PAGE coloré au TMBZ des membranes de *G. stearothermophilus* provenant de cellules produites en différentes conditions d'aération, ainsi que des membranes de *Bacillus subtilis*, servant de témoin pour l'expression de la CcOx *caa3*. Cette coloration permet de révéler spécifiquement les sous-unités contenant des hèmes *c*, liés covalamment. Au sein du super-complexe, trois sous-unités possèdent ces hèmes *c* : la sous-unité II de la CcOx *caa3*, les sous-unités *b₆* et SU IV-*c* du cytochrome *b₆c* (cf. figure I.18). Les membranes provenant des cultures en erlenmeyer contiennent une quantité de cytochrome *b₆c* largement supérieure à la CcOx *caa3*. La coloration au TMBZ n'est pas quantitative, certaines sous-unités se colorant beaucoup mieux que d'autres. Cependant, la comparaison de la coloration relative de la bande correspondant à la SU II de la *caa3* sur gel avec les membranes provenant des cultures en fermenteurs, ainsi que les membranes de *Bacillus subtilis*, contenant aussi ce complexe a permis de visualiser une différence d'expression.
- Les spectres optiques de cellules entières traduisent également cette différence d'expression (cf. figure III.1a). Les différences de spectres réduits (dithionite) moins oxydés (à l'air ambiant) permettent d'estimer le contenu en hèmes de l'échantillon. La bande d'ab-



(a)



(b)

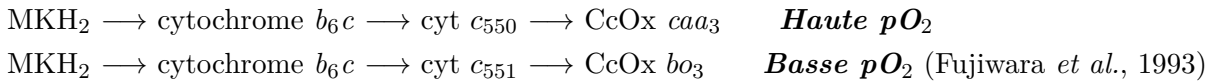
FIGURE III.1 – **Expression de la CcOx *caa3* en fonction des conditions de culture.** (a) Différences de spectres "dithionite-oxydé" sur cellules entières. Spectres enregistrés sur un spectrophotomètre développé au laboratoire UMR 7141, qui permet de réduire les effets de la diffusion. Croissance en fermenteurs : high O₂ (bleu clair); croissance en erlenmeyer : low O₂ (bleu foncé). (b) Gel SDS-PAGE coloré au TMBZ. Gauche : membranes de *G. stearothermophilus*, produites en condition de basse ou haute pO₂. Droite : membranes solubilisées de *B. subtilis* et de *G. stearothermophilus* produites en basse pO₂. Les membranes (Mb) sont solubilisées 30 min à température ambiante avec 15mM de β -DDM. Une centrifugation à haute vitesse permet la séparation des protéines solubilisées (le surnageant : S) et non solubilisées (le culot : C).

sorption à 604 nm de l'hème *a* de la CcOx *caa3* est visible dans le cas des cellules cultivées en fermenteurs, mais est remplacée par un épaulement autour de 568 nm dans le cas des cellules cultivées en erlenmeyer, pouvant correspondre à un hème *b* ou un hème *o*. Pour une description plus détaillée des spectres des composants du super-complexe cf. III.3.3.

D'après Sone *et al.* (1990), l'expression des CcOx terminales de *Bacillus sp. PS3*, un proche parent de *G. stearothermophilus*, varie selon les conditions de culture et notamment la pO_2 du milieu. Ces bactéries possèdent deux cytochromes *c* oxydases terminales (cf. figure I.19) :

- La CcOx *caa3* possède une affinité plus faible pour l' O_2 , et est exprimée en condition de forte aération. Elle appartient à la famille des SoxM (cf. I.1.5).
- la CcOx *bo3*, qui commence à être exprimée lorsque la pression d'oxygène diminue dans le milieu présente une forte affinité pour l'oxygène, et appartient à la famille des SoxB.

Geobacillus stearothermophilus possède deux voies métaboliques permettant le passage des électrons du pool de ménaquinone à l'oxygène, en passant par le cytochrome *b₆c*, dont l'expression dépend de la pO_2 du milieu :



L'expression préférentielle d'une voie ou de l'autre se traduit donc au niveau de l'expression de la CcOx *caa3*, mais est également visible au niveau de l'expression des cyt *c* associés aux oxydases : en condition de forte aération, la bande correspondant au cyt *c₅₅₀* est plus abondante que la bande du cyt *c₅₅₁*, et inversement en condition de faible aération (cf. figure III.1b).

Si l'aération n'est pas suffisante la cytochrome CcOx *caa3* n'est plus exprimée, elle est remplacée par une cytochrome *c* oxydase *bo3*. Nous nous intéressons à la CcOx *caa3* car des données biochimiques suggèrent qu'elle forme un super-complexe avec le cytochrome *b₆c* (Sone *et al.*, 1987), alors qu'aucunes données n'existent sur la présence d'un super-complexe incluant la CcOx *bo3*. Les conditions de culture en erlenmeyer n'ont pas permis d'obtenir une expression suffisante du complex CcOx *caa3*. Pour cela, il convient d'utiliser des fermenteurs de 2L ou 30L couplés à des sondes à oxygène, avec une aération vigoureuse. La culture est arrêtée lorsque la $pO_2 \leq 70\%$. La croissance est très rapide : le temps de génération est d'environ 30 min en phase de croissance exponentielle. L'utilisation de fermenteurs permet de mieux contrôler les paramètres de cultures, mais aussi de produire plus de biomasse (~ 10 g de cellules par litre de culture).

Le contenu en oxydases terminales a également été vérifié par spectroscopie des hèmes et par des spectres de liaison au CO, révélant la présence d'une hétérogénéité au niveau du site actif de la cytochrome *c* oxydase *caa3*, où l'hème *a* peut être substitué par un hème *o* (cf. III.3.5).

III.2 Purification

Cette étude diffère d'autres démarches de biochimie sur les super-complexes. L'objectif n'est pas la purification et la caractérisation d'un super-complexe tel qu'on peut l'observer au sein des membranes, mais la mise en place d'un protocole de purification en vue d'études structurales. Pour cela, l'accent a été mis sur l'isolement d'un objet homogène et stable.

Peu de données biochimiques étant disponibles pour le super-complexe de *G. stearothermophilus*, un grand nombre de paramètres vont donc devoir être testés, certains au préalable fixés arbitrairement, puis modifiés au fil du développement du protocole. Chaque expérience effectuée en appelle une autre. Plutôt que d'adopter une démarche systématique, où chaque expérience est répétée plusieurs fois pour assurer un résultat et une caractérisation, nous avons favorisé un échantillonnage plus vaste, pouvant entraîner des résultats moins assurés, mais compensés par une vision biochimique plus large de notre objet d'étude.

Le super-complexe a été exprimé en condition native, sans sur-expression ni étiquette. La démarche empruntée lors de ce travail a été de partir du protocole le plus simple, et au fur et à mesure, d'ajouter de nouvelles étapes, de changer les tampons utilisés, et d'observer les conséquences sur l'échantillon. Cette thèse marquant le début du projet, nous avons souvent avancé "à l'aveugle", sans toujours comprendre nos résultats.

III.2.1 Solubilisation et test de détergents

Les détergents sont des molécules amphiphiles, possédant une tête polaire et une queue hydrophobe, permettant l'extraction des protéines membranaires de la bicouche lipidique ainsi que leur maintien en solution, conditions indispensables à leur purification (cf. figure III.2). De nombreux détergents existent, avec différentes propriétés physico-chimiques et différents impacts sur les protéines membranaires. La solubilisation est une étape clé de la purification, pouvant entraîner l'inactivation ou la dénaturation des protéines. Pour une revue sur les détergents, voir le Maire *et al.* (2000).

Le choix du détergent et des conditions de solubilisation sont importants pour les super-complexes, qui sont des assemblages de plusieurs complexes protéiques et de lipides. La nature des interactions stabilisant le super-complexe n'est pas connue, mais il est fortement probable que les lipides jouent un rôle central. Les conditions de solubilisation et de purification ne doivent pas être trop délipidantes pour ne pas risquer une dissociation. De plus, nous avons pu observer qu'il existe une large variété d'assemblages de tailles variables selon le protocole d'extraction de la membrane. En effet, d'après la littérature, une membrane solubilisée en digitonine ou en β -DDM ne montrera pas les mêmes assemblages supra moléculaires (García Montes de Oca *et al.*, 2012). Cette observation est très importante dans notre étude : nous voulons purifier un

Image copyright

FIGURE III.2 – **Schéma du processus de solubilisation d’une protéine membranaire.** (a) Les monomères de détergent s’associent pour former des micelles (b) lorsque la concentration est au-dessus de la cmc. Les micelles peuvent extraire les protéines des membranes (c), en formant une solution contenant des complexes lipide-protéine-détergent, des micelles mixtes (lipide-détergent) et des monomères de détergent(d). Tiré de Newby *et al.* (2009).

super-complexe stable et homogène. Cela signifie qu’il faudra travailler avec des conditions de détergent assez douces pour ne pas endommager le super-complexe, mais qui soit assez dissociantes pour séparer les protéines associées faiblement au super-complexe et obtenir un objet homogène.

Trois détergents ont été utilisés au cours de cette étude (cf. table III.1) :

- Le β -DDM ($C_{12}M$) est le détergent utilisé pour la purification et la cristallisation du cytochrome b_6f , et également un détergent largement employé pour les études structurales de protéines de membrane.
- Le $C_{12}E_8$ est un polyoxyéthylène également utilisé en cristallisation. Il possède une tête flexible, ce qui peut laisser espérer une meilleure adaptation de la micelle à la protéine, et peut-être une facilité à constituer des bicouches.
- La FC_{14} (C_{14} Choline ou FOS Choline 14). Ce détergent, conçu comme un mimétique de lipide avec une tête choline est parfois à tort considéré comme moins dissociant. Pourtant, ce détergent a plutôt un effet déstabilisant sur certaines protéines, comme le cytochrome b_6f (Daniel Picot, communication personnelle), probablement à cause de ce mimétisme de lipide, la molécule de détergent pouvant s’insérer dans des sites spécifiques de la protéine et entraîner la dénaturation. Ce détergent est peu utilisé en cristallisation.

L'objectif de l'utilisation de ce détergent était d'avoir comme contrôle un détergent avec des propriétés plus dissociantes, mais avec une cmc proche de celles du β -DDM et du $C_{12}E_8$. Comme nous le verrons plus loin ce détergent est effectivement dissociant, mais il permet tout de même de purifier un super-complexe.

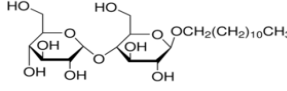
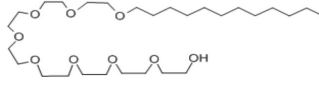
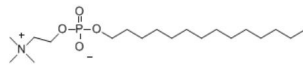
Détergent	Cmc % (w/v)/ mM	Solubilisation % (w/v)/ mM / ratio prot:détergent	Structure
β -DDM ($C_{12}M$)	0.0087 / 0.17	0.77 / 15 / 1,6:1	
$C_{12}E_8$	0.0048 / 0.1	-	
FC_{14}	0.0046 / 0.12	0.38 / 10 / 3,2:1	

TABLE III.1 – Détergents utilisés pour l'étude du super-complexe.

Nous sommes partis de ces trois détergents pour mettre en place le protocole de purification d'un super-complexe stable. Ayant obtenus des résultats encourageants, nous n'avons pas testé d'autres détergents au cours de cette étude, mais c'est une des perspectives de ce travail.

Les concentrations de détergent utilisées pour la solubilisation ont été déterminées en effectuant des gammes de solubilisation (cf. II). La figure III.3 présente un gel SDS-PAGE d'une gamme de solubilisation en FC_{14} , montrant que le super-complexe est extrait de la membrane, même à des faibles concentrations de détergent. Le β -DDM et la FC_{14} ont permis la solubilisation du super-complexe, avec des concentrations optimales de 15 mM et 10 mM respectivement. Cela correspond à des ratios protéines:détergent de 1,6:1 dans le cas du β -DDM et de 3,2:1 pour la FC_{14} , qui sont faibles en comparaison de ratios habituellement utilisés pour la solubilisation de protéines membranaires, se trouvant généralement plutôt autour de 1:1 ou de 1:3, mais permettant l'isolement de quantités correctes de matériel, sans entraîner de délipidation excessive et de dissociation.

La durée de la solubilisation a, dans un premier temps, été arbitrairement fixée à 30 minutes, puis lors de l'évolution de la purification a été augmentée à 45 minutes. Des expériences de solubilisation à différentes températures (4°C, 23°C et 37°C) ont permis d'observer une influence significative de la température sur la solubilisation (cf. figure III.4). La solubilisation des membranes à température ambiante (23°C) a été choisie pour différentes raisons. Le rendement à 37°C est meilleur qu'à 4°C, mais le passage des protéines à 37°C pendant 30 minutes peut être

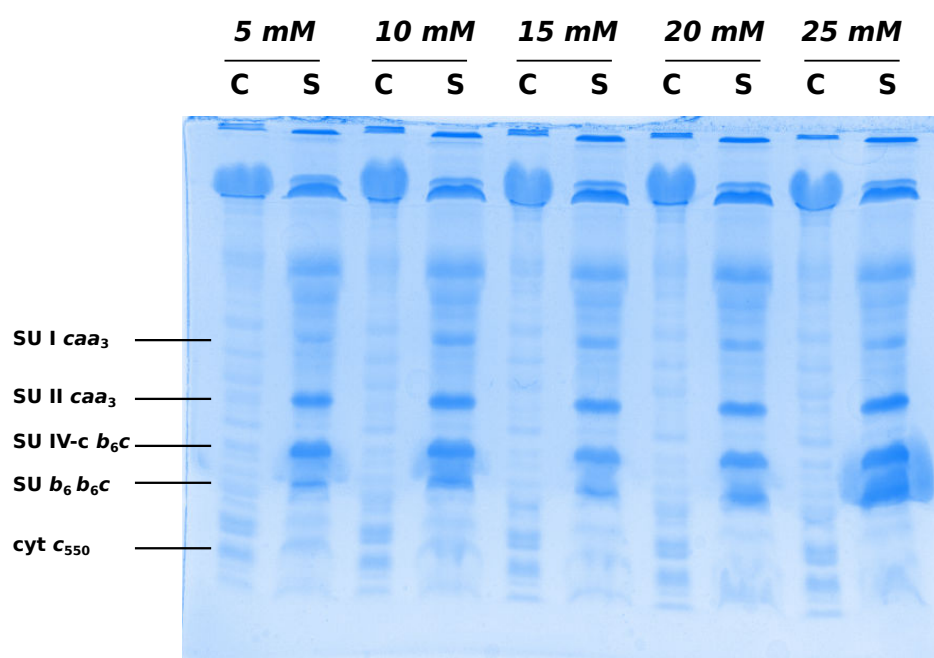


FIGURE III.3 – **Gel SDS-PAGE des membranes après solubilisation en FC_{14} .** Les membranes sont solubilisées 30 minutes à température ambiante avec des concentrations croissantes de FC_{14} . Une ultracentrifugation permet la séparation des protéines solubilisées (le surnageant) et non solubilisées (le culot). Pour chaque concentration dans le premier puit : le culot(C) ; dans le second puit : le surnageant(S). Coloration au bleu de Coomassie, après coloration au TMBZ. L'augmentation de la concentration de détergent ne semble pas permettre de solubiliser plus de protéines à partir de 10 mM.

une étape délicate pour la stabilité des protéines. $23^{\circ}C$ est un compromis permettant un rendement de solubilisation correct en limitant les risques de déstabilisation. Enfin la solubilisation à température ambiante sur la paillasse a également un aspect pratique.

Le $C_{12}E_8$ n'a pas permis l'extraction du super-complexe de la membrane, dans les conditions expérimentales (cf. figure III.5). Cependant, des contaminants importants de la purification sont solubilisés par ce détergent, comme les bandes à ~ 100 kDa retrouvées à des stades avancés de la purification sur nos gels SDS-PAGE. Nous avons alors tenté de faire une double solubilisation des membranes : d'abord en $C_{12}E_8$ pour éliminer les contaminants puis en β -DDM ou FC_{14} afin d'extraire le super-complexe de la membrane. Cette technique a été abandonnée car le rendement étant très faible, elle ne permettait pas la purification.

Cependant, même si le $C_{12}E_8$ n'est pas un détergent permettant la solubilisation du super-complexe (dans nos conditions expérimentales), il nous semblait un détergent intéressant pour manipuler un gros complexe de protéine membranaire. Le super-complexe a été purifié à la fois en β -DDM et en FC_{14} . Des échanges de détergent à différentes étapes de la purification sont possibles (cf. III.2.3). Par la suite, la purification en FC_{14} a plutôt servi aux études spectroscopiques alors que le β -DDM a été utilisé lors des tentatives de cristallisation. L'aller-retour entre les deux détergents nous a également permis de mieux comprendre le comportement de

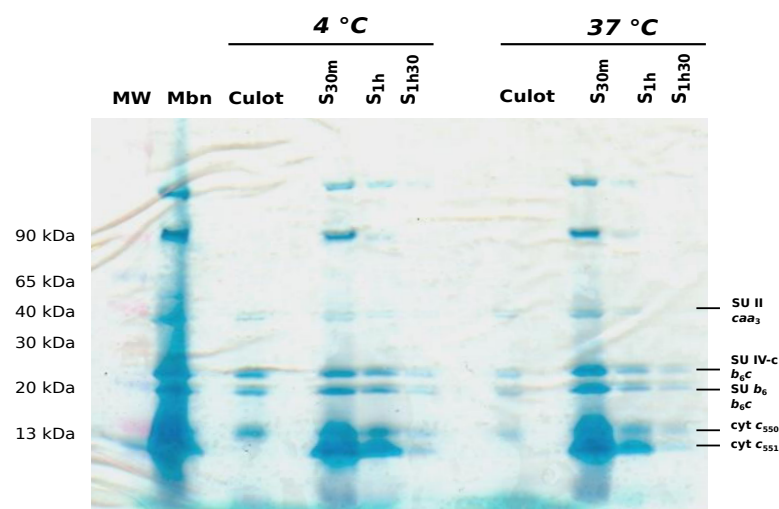


FIGURE III.4 – **Influence de la température sur la solubilisation des membranes.** Gel SDS-PAGE coloré au TMBZ. Les membranes sont solubilisées 30 min à 15mM de β -DDM soit dans la glace (4°C) soit au bain marie à 37°C, puis les protéines solubilisées sont séparées des membranes par une étape d’ultracentrifugation. Cette étape est répétée trois fois, en reprenant le culot et en le resolubilisant. A chaque étape de solubilisation, le ratio protéine:détergent est donc totalement différent, mais cette expérience permet d’estimer la quantité de complexe extraite à chaque étape. Le culot est le culot final obtenu après la troisième solubilisation. Ce test a été réalisé sur des membranes issues de cultures en erlenmeyer, qui donc contiennent peu de CcOx *caa*₃, expliquant la bande plus faible autour de 40 kDa.

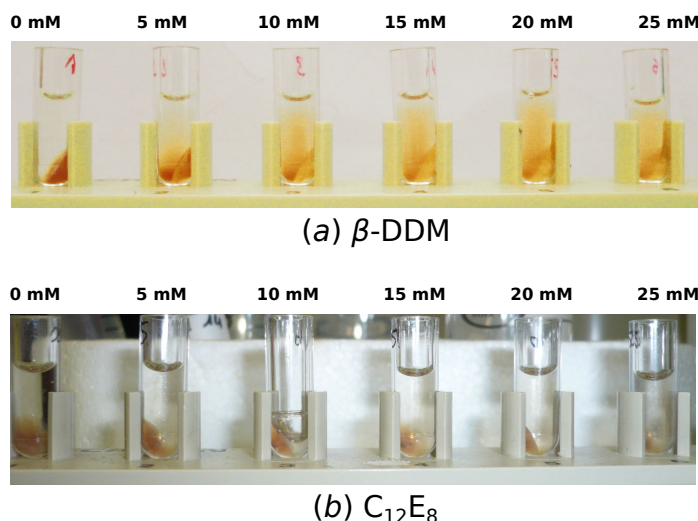


FIGURE III.5 – **Centrifugation des membranes après solubilisation en β -DDM et $C_{12}E_8$.** Les membranes sont solubilisées 30 minutes à température ambiante avec agitation, en utilisant des concentrations croissantes de (a) β -DDM et (b) $FC_{14}C_{12}E_8$. Une ultracentrifugation permet la séparation des protéines solubilisées (le surnageant) et non solubilisées (le culot). Le super-complexe contient des hèmes, et possède une couleur rouge/orangée : dans le cas d’une bonne solubilisation le surnageant est fortement coloré et le culot blanchâtre.

l’échantillon lors des purifications, et d’émettre des hypothèses sur son état oligomérique (cf. IV).

III.2.2 *G. stearothermophilus* possède-t-il un super-complexe ?

La première étape de ce travail a été la validation de l'hypothèse de l'existence d'un super-complexe entre le cytochrome b_6c et la CcOx caa_3 chez *G. stearothermophilus*. Pour cela, différentes techniques de séparation ont été utilisées, basées sur différentes propriétés physico-chimiques des protéines. Une constante co-élution des sous-unités du cytochrome b_6c et de la CcOx caa_3 constitue une démonstration de leur organisation en super-complexe.

Afin de visualiser la co-élution entre les deux complexes, la migration sur gel SDS-PAGE suivie d'une coloration spécifique des hèmes au TMBZ est une technique adaptée. Elle permet une observation rapide des sous-unités protéiques contenant des hèmes c liés covalamment (la sous-unité II de la CcOx caa_3 , les sous-unités IV- c et b_6 du cytochrome b_6c et le cytochrome c_{550}), sans être gêné par les nombreuses autres bandes qui se colorent au bleu de Coomassie.

Co-migration sur gradient de saccharose

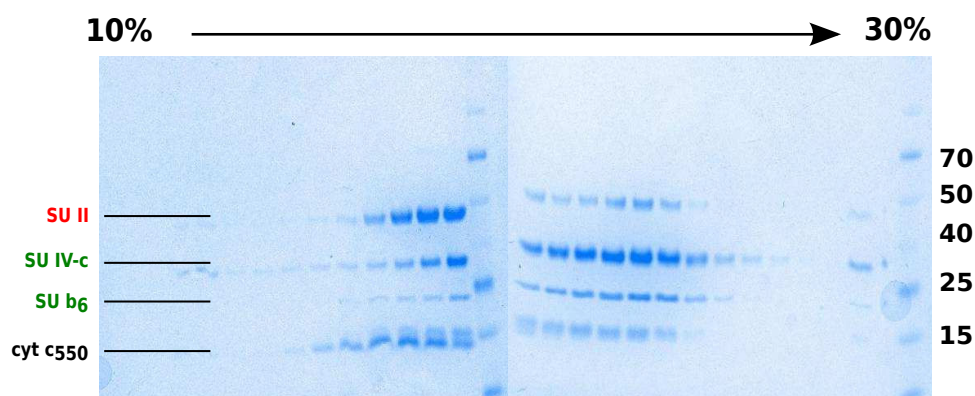


FIGURE III.6 – **Dissociation du super-complexe de *Bacillus subtilis* sur gradient de saccharose.** 200 μ l de membranes de *Bacillus subtilis*, solubilisées 30 minutes à 15 mM de β -DDM à température ambiante sont déposées sur un gradient de saccharose contenant 0,4 mM de β -DDM puis centrifugées 4 h à 50 000 rpm. Le gel SDS-PAGE des fractions du gradient traduit un décalage dans la migration de la sous-unité II de la CcOx caa_3 (SU II) et les sous-unités IV- c et b_6 du cytochrome b_6c , suggérant que dans les conditions expérimentales le super-complexe est majoritairement dissocié. Expérience et gels réalisés par Élodie Point-Bonnet.

Le gradient de saccharose permet la séparation des différentes espèces présentes selon leur densité et leur taille. La migration des échantillons sur gradient de saccharose permet de visualiser la présence ou non d'un super-complexe. En effet, dans le cas d'une dissociation du cytochrome b_6c et de la CcOx caa_3 , comme dans le cas des membranes de *Bacillus subtilis* solubilisées en β -DDM, les deux complexes protéiques ne co-migrent pas (cf. figure III.6). Or les complexes des chaînes respiratoires de *G. stearothermophilus* et de *Bacillus subtilis* sont très proches et possèdent un fort taux d'identité (93,8 % pour la sous-unité b_6 ou 80,1 % pour la sous-unité III de l'oxydase), donc la migration des complexes cytochrome b_6c et CcOx caa_3 de *Bacillus* peut être utilisée comme contrôle pour étudier la migration du super-complexe de *G.*

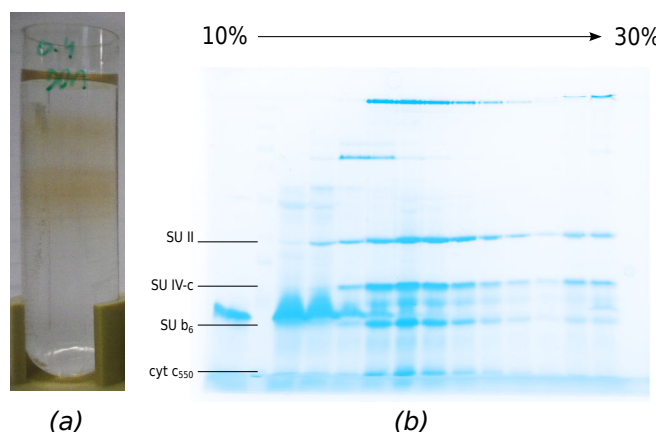


FIGURE III.7 – **Ultracentrifugation sur gradient de saccharose de membranes solubilisées.** 2 ml de membranes solubilisées 30 minutes à 15 mM de β -DDM à température ambiante sont déposées sur des gradients de saccharose contenant 0,4 mM de β -DDM. (a) Profil du gradient après ultracentrifugation 4 h à 50.000 rpm (rotor TLS 55). (b) Gel SDS-PAGE des fractions du gradient, coloration au TMBZ.

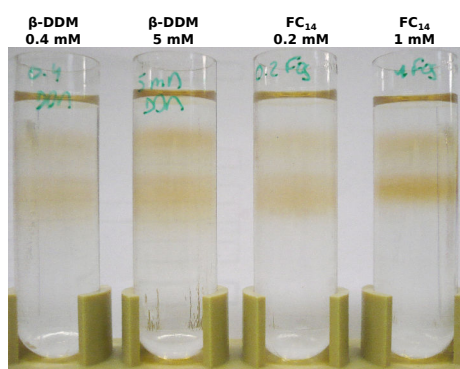


FIGURE III.8 – **Ultracentrifugation de membranes solubilisées sur gradient de saccharose.** 200 μ l de membranes solubilisées 30 minutes à 15 mM de β -DDM à température ambiante sont déposées sur des gradients de saccharose contenant différentes conditions de détergents. De gauche à droite : 0,4 mM et 5 mM de β -DDM, puis 0,2 mM et 1 mM de FC₁₄.

stearothermophilus.

La figure III.7 représente la migration des membranes de *G. stearothermophilus* solubilisées en β -DDM sur un gradient de saccharose, et le gel SDS-PAGE des fractions coloré au TMBZ. On observe deux bandes brunes/rouges sur le gradient : la bande haute correspond à une protéine contenant un cytochrome *c*, et ne participant pas au super-complexe. Sur le gel on visualise une co-migration du cytochrome *b₆c* et de la CcOx *caa₃* au niveau des fractions de la bande basse, montrant qu'elle contient le super-complexe.

Cette méthode a été utilisée pour tester différentes conditions de détergents (cf. figure III.8), afin de visualiser le comportement du super-complexe. Cependant, les conditions de détergents imposées n'ont pas entraîné de variations particulières, ce qui est probablement dû au fait que le super-complexe est assez robuste et que nos conditions n'étaient pas vraiment déstabilisantes.

Cependant, il est intéressant de noter que la bande basse du gradient contenant 1 mM de FC₁₄ est plus focalisée que celle des autres gradients, et légèrement plus haute, pouvant suggérer une population un peu plus homogène, moins dense ou plus petite. Ces données seront discutées dans la partie IV.

Co-élution sur colonne échangeuse d'ions

La chromatographie échangeuse d'ions permet une séparation des protéines selon leur charge. Le super-complexe se lie sur les colonnes échangeuses d'anions, chargées positivement, et peut être élué par un gradient de NaCl. La figure III.9 représente un chromatogramme d'élution et le gel SDS-PAGE des fractions de la purification du super-complexe sur une colonne échangeuse d'anions. Le super-complexe est élué sur plusieurs fractions, avec un pic à 200 mM de NaCl.

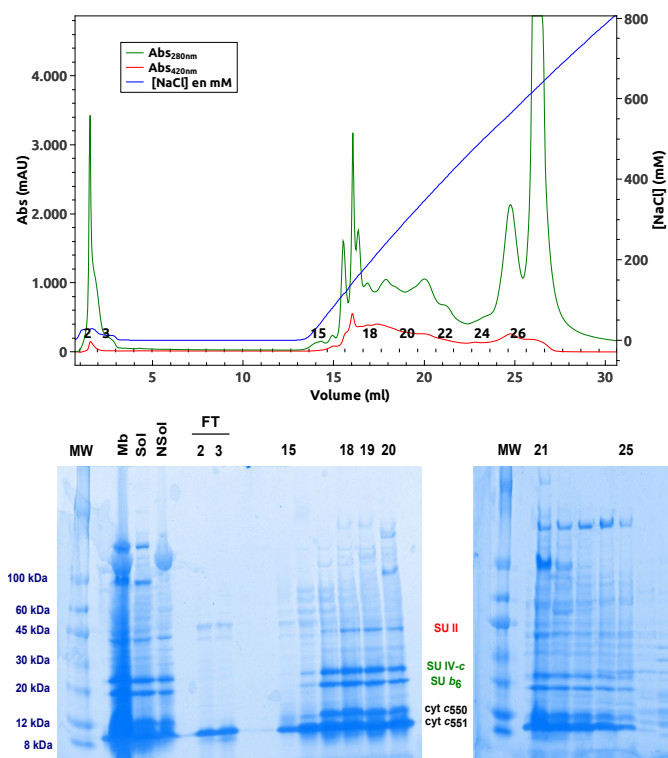


FIGURE III.9 – **Co-élution du cytochrome b_6c et de la CcOx caa_3 sur colonne échangeuse d'anions.** 1 ml de membranes solubilisées 30 minutes à 15 mM de β -DDM à température ambiante sont chargées sur une colonne échangeuse d'anions htq 1ml puis éluées par un gradient linéaire de NaCl **Haut** : Chromatogramme d'élution. Courbe rouge : Absorbance à 420 nm (mise en évidence des hèmes), courbe verte : absorbance à 280 nm. **Bas** : Gel SDS-PAGE des fractions de purification, coloré au bleu de Coomassie, après coloration au TMBZ, ce qui explique la forte coloration des sous-unités du super-complexe contenant un hème c , d'ordinaire faiblement colorées en bleu de Coomassie. Mb : membranes; Sol : membranes solubilisées (chargement de la colonne); NSol : Membranes non solubilisées; FT : protéines non attachées à la colonne; fractions de purification (15-25). En rouge : CcOx caa_3 ; en vert : cytochrome b_6c ; en noir : cyt c . Expérience réalisée avec des membranes issues de cultures en erlenmeyer, avec une faible expression de la CcOx caa_3 . Tampons utilisés : A_{1,D} et B_{1,D} (cf. tableau II.3).

Co-élution sur tamis moléculaire

La chromatographie d'exclusion de taille permet de séparer les molécules selon leur rayon hydrodynamique. Le pic d'élution de la colonne échangeuse d'ions contenant le cytochrome b_6c et la CcOx caa_3 peut être injecté sur une colonne de gel filtration. Dans ce cas également on constate une co-élution des deux complexes (cf. figure III.10).

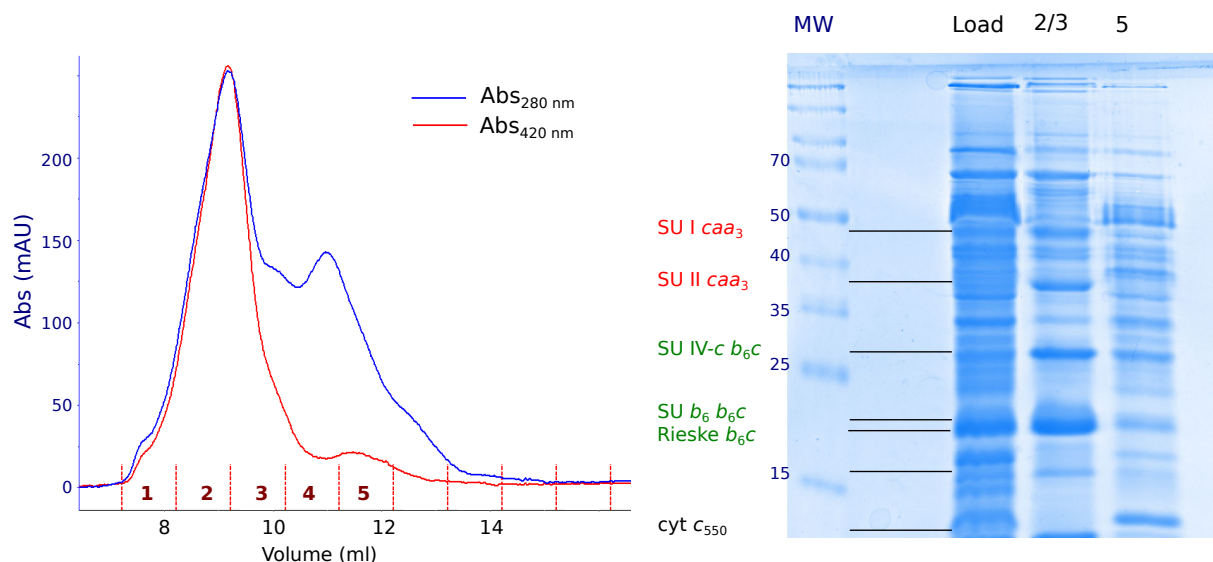


FIGURE III.10 – **Co-élution du cytochrome b_6c et de la CcOx caa_3 sur colonne de tamis moléculaire.** Injection des fractions contenant le cytochrome b_6c et la CcOx caa_3 issus de l'étape de chromatographie échangeuse d'ions sur la colonne Superdex 200. **Gauche** : profil d'élution du super-complexe. **Droite** : gel SDS-PAGE des fractions de purification, coloration au bleu de Coomassie. Tampon utilisé : $C_{1,D}$ (cf. tableau II.3).

La meilleure validation : la dissociation

Au cours de cette étude, il nous est apparu que le super-complexe peut être dissocié par une trop forte concentration de détergent. En effet, si les membranes sont solubilisées avec 30 mM de FC₁₄ (au lieu de 10 mM), le pic ordinairement présent à 200 mM de NaCl lors du passage sur colonne échangeuse d'ion, est remplacé par deux pics distincts, élués à 180 mM et 230 mM de NaCl. La migration sur gel SDS-PAGE suivit d'une coloration au TMBZ permet d'identifier le premier pic comme contenant le cytochrome b_6c , et le second pic à 230 mM de NaCl comme contenant la CcOx caa_3 (cf. figure III.11). Cette observation confirme le caractère fondamental du choix du détergent et des conditions de solubilisation.

Le cytochrome c_{550} participe au super-complexe

Toutes les méthodes utilisées pour montrer la co-élution du cytochrome b_6c et de la CcOx caa_3 entraînent la co-élution d'une protéine supplémentaire, le cytochrome c_{550} , le partenaire réactionnel faisant la liaison entre les deux complexes, suggérant son appartenance au super-complexe. La présence de cette bande de 12 kDa sur gel SDS-PAGE est également observée

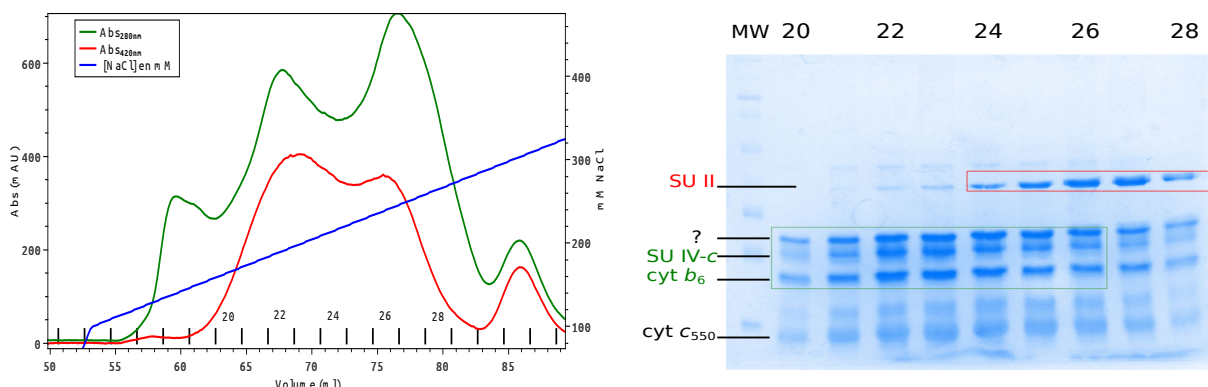


FIGURE III.11 – **Chromatographie échangeuse d'anions du super-complexe dissocié.** 6 ml de membranes sont solubilisées 45 min à 30 mM de FC₁₄. Le surnageant d'ultracentrifugation est ensuite soumis à une ultracentrifugation sur gradient de saccharose, et la bande basse est injectée sur une colonne échangeuse d'anions. **Gauche :** Profil d'élution du super-complexe dissocié sur colonne htq 5ml. **Droite :** Gel SDS-PAGE du super-complexe dissocié détergent. En vert : *cytochrome b₆c* ; en rouge : *CcOx caa₃*. Ce gel possède une bande additionnelle qui colore au TMBZ autour de 30 kDa, qui a été visualisée à quelques rares occasions, nous ne pouvons pas expliquer à quoi est due cette bande supplémentaire. Tampons utilisés : A_{1,F} et B_{1,F} (cf. tableau II.3).

au sein du super-complexe de *Bacillus sp. PS3* (Sone *et al.*, 1987), mais identifiée comme une quatrième sous-unité du complexe Rieske/*b* par les auteurs.

III.2.3 Mise en place d'un protocole de purification

Le super-complexe de *G. stearothermophilus* ne possède pas d'étiquette pour faciliter la purification, nous avons donc utilisé une biochimie plus "classique". Comme il a été détaillé dans le paragraphe précédent, différentes techniques permettent l'isolement du super-complexe :

- la chromatographie échangeuse d'anions
- l'ultracentrifugation sur gradient de saccharose
- la chromatographie d'exclusion de taille (ou tamis moléculaire)

Aucune de ces techniques seule ne permet d'isoler un super-complexe sans autres contaminants. Pour atteindre cet objectif, nous avons combiné différents modes de séparation, en testant de nombreux protocoles de purification résultants de différentes combinaisons, mais également de différentes conditions de détergent. Le protocole de purification a beaucoup évolué. Dans ce paragraphe, l'idée est d'essayer de résumer deux ans et demi de mise au point, en tentant de décrire certaines des étapes décisives et certains de nos choix en terme de détergents utilisés, de techniques employées. La mise en place d'un protocole se fait par étapes successives, avec des retours en arrière et des changements de stratégies, il est parfois difficile d'échapper à une certaine description chronologique des événements.

Les préoccupations principales que nous avons eu au cours de cette thèse ont été :

1. La composition du super-complexe, ou des super-complexes ?
2. L'identification des différents pics obtenus en chromatographie échangeuse d'ions. Pen-

dant longtemps nous n'étions pas en mesure de comprendre nos chromatogrammes, en raison de superpositions de pics et de la présence de très nombreuses bandes sur gels. Ce problème a été en partie résolu par la cristallisation de la Sdh (succinate déshydrogénase).

3. L'influence des détergents sur la purification
4. L'obtention d'un super-complexe débarassé des contaminants
5. La compréhension de l'état oligomérique du super-complexe, et l'obtention d'un échantillon homogène

Le protocole de purification s'est construit autour de la chromatographie échangeuse d'anions. En fonction des questions posées, nous avons employé différentes méthodes, et parfois été induits en erreur par certains résultats. La plupart des expériences présentées par la suite ont été réalisées avec le β -DDM et la FC₁₄, qui permettent la solubilisation et la purification du super-complexe. La question du choix du détergent a été une interrogation constante et un point clé pour comprendre les assemblages supra-moléculaires. Ce paramètre sera discuté plus en détail par la suite.

L'introduction d'un gradient de saccharose

Protocole 1 : gradient de saccharose - échangeuse d'ions htq 5ml

Une étape de purification des membranes solubilisées de *G. stearothermophilus* par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne htq 5ml permet un enrichissement de l'échantillon en super-complexe, mais de nombreuses autres protéines sont co-éluées. L'introduction d'une étape d'ultracentrifugation sur gradient de saccharose permet de séparer les protéines selon leur densité et de se débarrasser d'un grand nombre de protéines de faible poids moléculaire.

Cette étape peut être effectuée avant ou après l'étape de chromatographie. Cependant, le passage de l'échantillon sur le gradient entraîne une certaine dilution et une séparation assez grossière, en comparaison de la colonne échangeuse d'ions où le volume d'élution peut être ajusté. De plus, l'échantillon purifié se trouve dans un tampon concentré en saccharose (autour de 20 %), donc très visqueux. Il est préférable, à la fois d'un point de vue pratique mais aussi au niveau du rendement de la purification, de commencer par l'étape de gradient de saccharose avant le passage de l'échantillon sur colonne.

Protocole : 6 ml de membranes sont solubilisées en β -DDM ou FC₁₄, puis les membranes solubilisées sont déposées sur un gradient linéaire 10% - 30% de saccharose de 10 ml (contenant 0,4 mM de β -DDM ou 0,4 mM FC₁₄ en fonction du détergent utilisé pour la solubilisation) et soumises à une étape d'ultracentrifugation pendant la nuit. Elles sont ensuite injectées sur la colonne htq 5ml.

La figure III.12 présente les profils d'élution sur colonne échangeuse d'ion de deux échantillons : à gauche, les membranes solubilisées en β -DDM puis directement injectées sur la

colonne, à droite, ces membranes ont au préalable subi une étape de centrifugation sur gradient de saccharose. Si l'absorbance à 420 nm (absorbance des hèmes) est comparable entre les deux expériences (autour de 600 mAU), on remarque que l'absorbance à 280 nm est beaucoup plus forte dans le premier chromatogramme. Le rapport Abs_{420}/Abs_{280} est bien meilleur si l'échantillon a été préalablement soumis à une étape de centrifugation sur gradient de saccharose. Une grande partie des protéines dont les pics d'élution se superposent à celui du super-complexe est éliminée à cette étape, et le profil d'élution est largement simplifié.

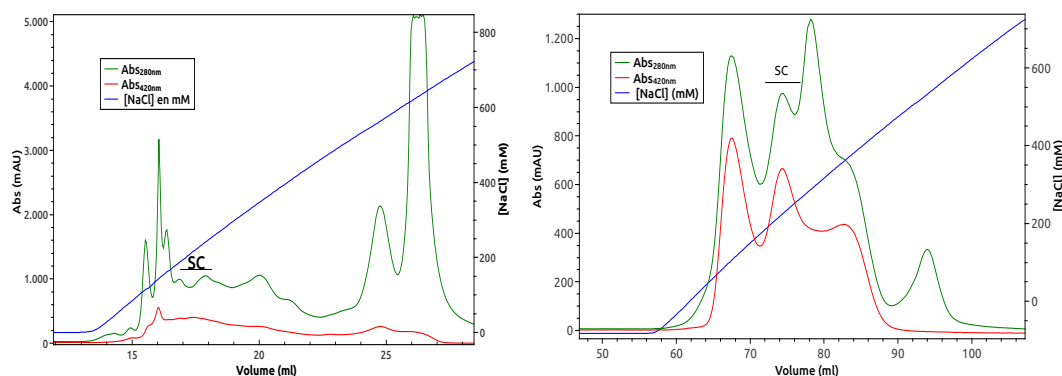


FIGURE III.12 – **Introduction d'un gradient de saccharose.** **Gauche :** Profil d'élution de 1 ml de membranes solubilisées en β -DDM sur colonne htq 1ml. **Droite :** Profil d'élution de 6 ml de membranes, préalablement purifiées par gradient de saccharose, sur colonne htq 5ml. Les fractions d'élution du super-complexe sont marquées par un trait noir. Les deux colonnes ont les mêmes propriétés mais des volumes différents : 1 ml ou 5 ml. Avant l'ajout du gradient, les volumes de membranes solubilisées étaient plus faibles et une colonne de 1 ml était adaptée. Pour des volumes plus important une colonne avec un plus grand volume est nécessaire. Tampons utilisés : $A_{1,D}$ et $B_{1,D}$ (cf. tableau II.3).

Conclusion : Le gradient de saccharose est régulièrement utilisé pour isoler des super-complexes (Iwai *et al.*, 2010; Althoff *et al.*, 2011). Dans le cadre de notre protocole de purification, il permet un enrichissement significatif de l'échantillon avant la chromatographie, ainsi que l'élimination de nombreuses protéines qui co-éluent avec le super-complexe sur colonne échangeuse d'ions. Cette étape supplémentaire est une étape indispensable à l'obtention d'un super-complexe purifié en vue d'études structurales. Son remplacement par une étape de chromatographie, beaucoup plus rapide, a été testée mais l'échantillon obtenu n'est pas aussi pur qu'avec le gradient.

Chromatographie échangeuse d'anions : comment augmenter la résolution ?

Même après l'introduction de l'étape de gradient de saccharose, une étape unique de chromatographie ne permet pas l'obtention d'un pic de super-complexe purifié. Afin de séparer les différentes espèces, deux stratégies ont été combinées :

1. L'utilisation de deux colonnes échangeuses d'anions. Une première colonne relativement rapide et assez grossière permettant d'éliminer une grande partie des protéines contami-

nantes, puis une seconde étape plus séparative.

2. Le remplacement de la colonne htq 5ml par une autre colonne plus résolutive.

• Ajout d'une étape supplémentaire de chromatographie

Protocole 2 : gradient de saccharose - Q ceramic - htq 5ml

L'introduction de la colonne échangeuse d'anion Q ceramic, après le gradient de saccharose permet l'obtention d'un pic composite à 200 mM de NaCl. Cette résine est légèrement différente de la résine de la colonne htq 5ml, et présente l'avantage d'être résistante à un flux important (entre 2,5 ml/min pour une colonne de 20 ml et 7 ml/min pour 100 ml). Le volume de la colonne peut facilement être ajusté pour la purification de plus de super-complexe.

Protocole : Les membranes solubilisées en β -DDM ou FC₁₄ sont centrifugées sur un gradient de saccharose. La bande basse du gradient est prélevée à l'aide d'une seringue et injectée sur une colonne Q ceramic de 20 ml, puis éluée en 5 CV. Tampons utilisées : A_{1,D} et B_{1,D} ou A_{1,F} et B_{1,F}, en fonction du détergent utilisé pour la solubilisation.

La figure III.13 montre un profil d'élution et le gel SDS-PAGE des fractions de purification du super-complexe sur une colonne de Q ceramic. Comme souvent durant cette étude, le profil d'élution est compliquée, et la coloration au TMBZ permet d'identifier les fractions contenant le super-complexe, éluant à 200 mM de NaCl, comme dans le cas de la colonne htq 5ml. Le gel montre la présence de nombreuses autres protéines co-éluant avec le super-complexe, cette expérience permet une bonne illustration de l'intérêt de la coloration au TMBZ : il aurait été impossible de raisonner sur le gel coloré au bleu de Coomassie, car il contient beaucoup trop de bandes, et les bandes des sous-unités du super-complexe ne sont pas majoritaires. De plus, le fait que le pic du super-complexe soit étalé, et les autres bandes difficiles à identifier, ne rend pas l'attribution des différents pics aisée.

Conclusion : La capacité de la colonne étant plus importante, il est ainsi possible de purifier plus d'échantillon. Le passage de la bande basse du gradient sur la colonne permet l'élimination d'une quantité importante de protéines, avant et après le pic de super-complexe (cf. figure III.13). Le pic est alors dialysé et passé sur une colonne htq 5ml. Cette seconde étape de chromatographie pourra être plus résolutive car la quantité de protéines chargée sera moindre.

• Utilisation d'une colonne plus résolutive

Protocole 3 : gradient de saccharose - Q ceramic - Mono Q

La colonne Mono Q est une colonne plus résolutive que la htq 5ml, à la fois grâce à son volume plus important et son diamètre réduit, mais également grâce à la densité élevée de groupements pouvant fixer les protéines.

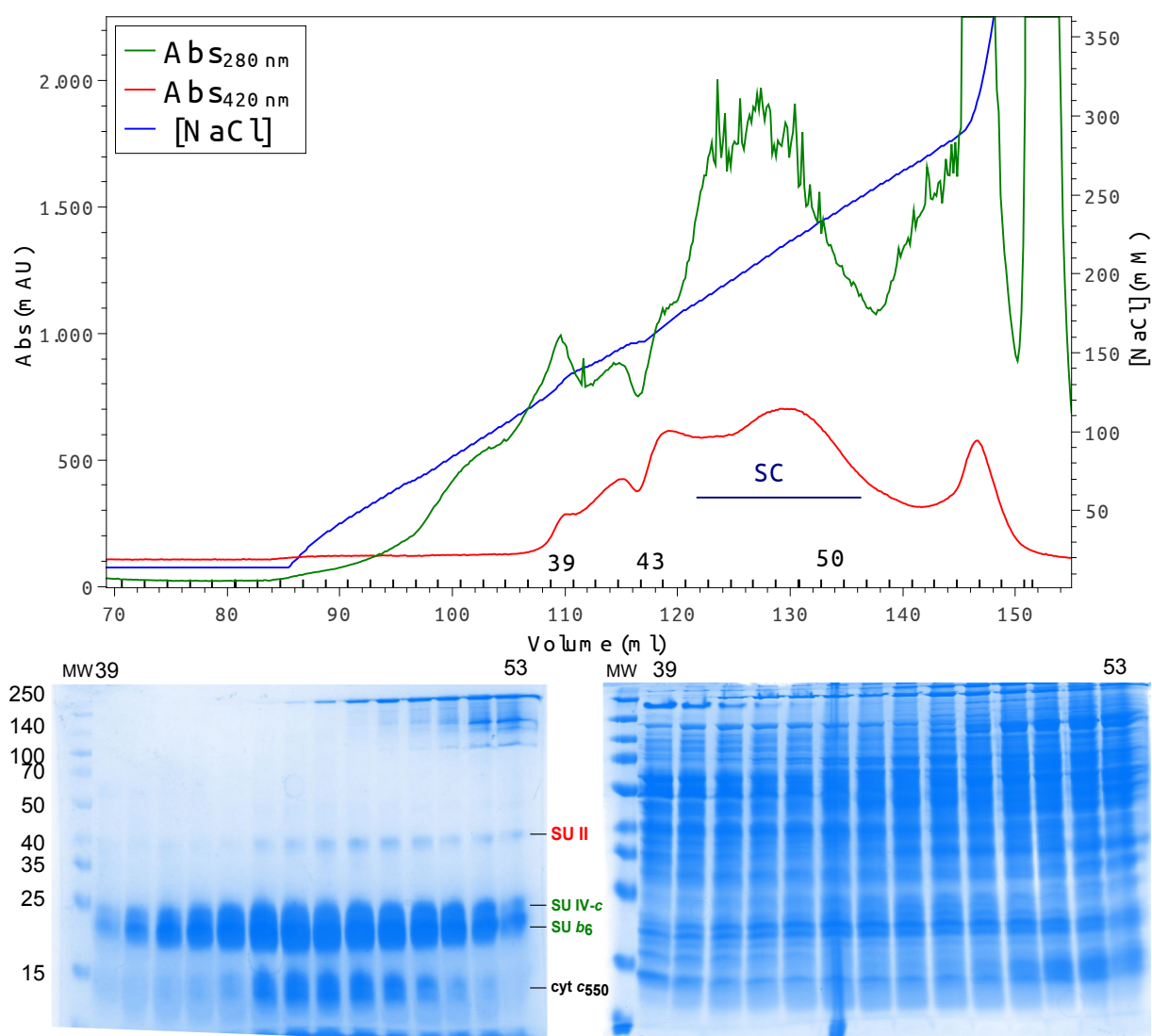


FIGURE III.13 – **Chromatographie sur colonne Q ceramic.** Haut : Profil d'élution sur colonne Q ceramic de 20 ml. Le super-complexe est élué à 200 mM de NaCl. Tampons utilisés : $A_{1,D}$ et $B_{1,D}$ (cf. tableau II.3). Bas : Gels SDS-PAGE des fractions de purification. Le gel de gauche est coloré au TMBZ, le gel de droite est coloré au bleu de Coomassie. Les fractions 45 à 51 sont récupérées pour la suite de la purification.

Protocole : Le pic d'élution du super-complexe sur la colonne Q ceramic de 20 ml est dialysé pendant 1 h contre 1 L de tampon Tris pH 8 à 20 mM, puis injecté sur la Mono Q et élué par un gradient de NaCl (0-1 M) en 20 CV.

La table III.2 compare la purification de deux échantillons de super-complexe, un sur une colonne htq 5ml et l'autre sur la colonne Mono Q. L'utilisation de cette nouvelle colonne permet une meilleure séparation du super-complexe des autres protéines, ce qui est plus visible sur le gel SDS-PAGE que sur le chromatogramme. Nous avons notamment pu observer la présence de cytochrome b_6c isolé, dont le pic est confondu avec celui du super-complexe sur la colonne htq 5ml, mais séparé sur la Mono Q (trait vert sur le gel de la table III.2 et flèche sur table III.3).

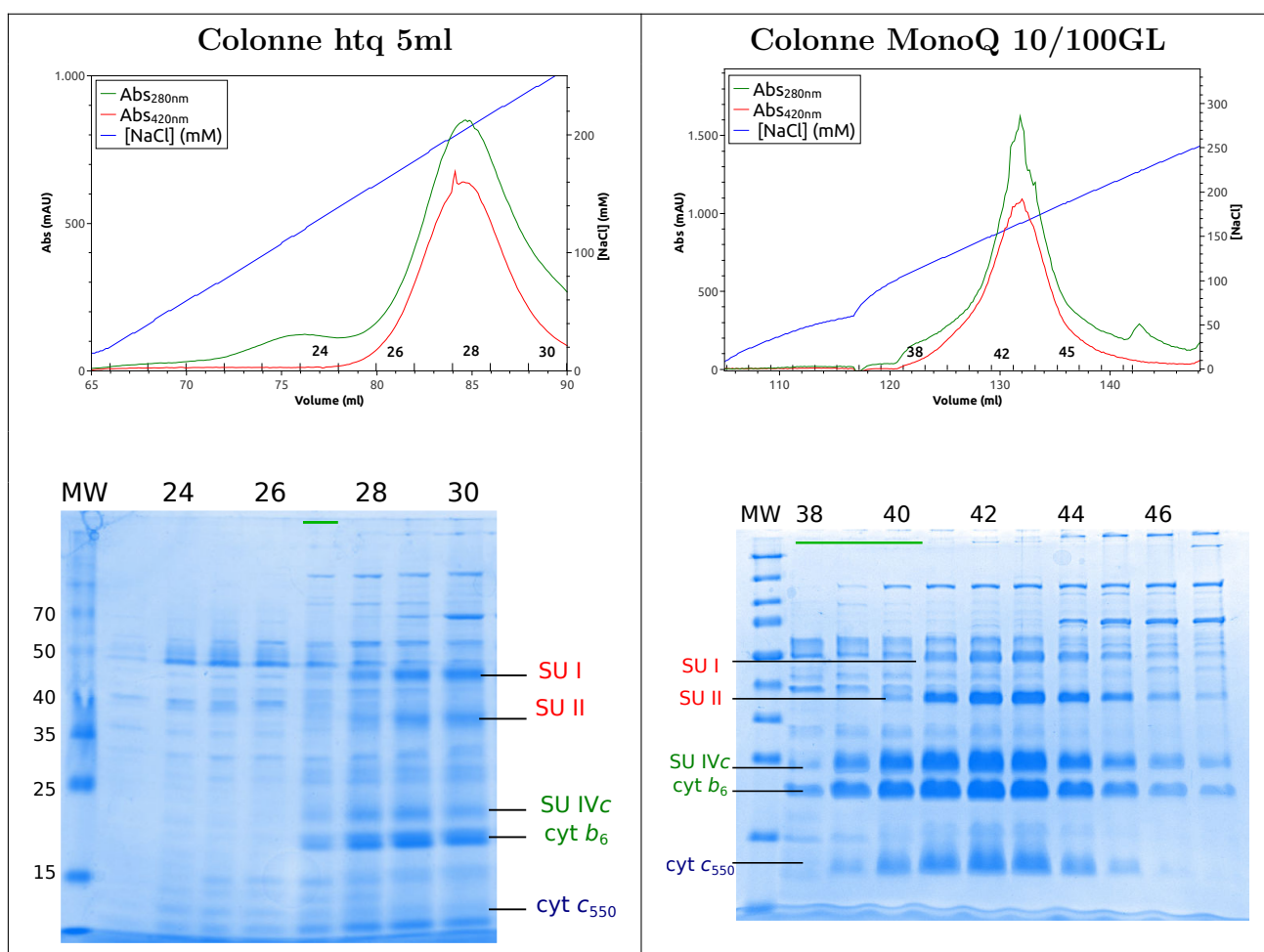


TABLE III.2 – **Utilisation d'une colonne plus résolutive.** Les chromatogrammes sont "normalisés" sur la pente du gradient de NaCl. **Gauche :** Profil d'éluion sur colonne htq 5ml. Tampons : A_{1,D} et B_{1,D}. **Droite :** Profil d'éluion sur colonne Mono Q 10/100 GL. Tampons : A_{2,D} et B_{2,D} (cf. tableau II.3). En bas : gels SDS-PAGE des fractions de purification. La ligne verte sur le gel représente les fractions contenant du cytochrome *b*₆*c* isolé. Coloration au bleu de Coomassie après coloration au TMBZ.

Conclusion : La colonne htq 5ml a été remplacée par la colonne Mono Q. Suite à l'évolution du protocole, la colonne Q ceramic de 20 ml a été éliminée, et l'échantillon est par la suite injecté deux fois sur la colonne Mono Q, pour une meilleure résolution des pics. Dans ce nouveau protocole, la bande basse du gradient de saccharose est injectée une première fois sur la colonne, puis éluée en 20 CV. Le pic à 200 mM de NaCl contient le super-complexe, mais également un peu de cytochrome *b*₆*c* isolé, car les pics se chevauchent. Ce pic est dialysé pour retirer le sel, puis réinjecté sur la colonne avec un gradient plus fin (25 CV), permettant un isolement du super-complexe sans cytochrome *b*₆*c* isolé.

Comment éviter la délipidation excessive de l'échantillon ?

Protocole 4 : Q ceramic - gradient de saccharose - colonne échangeuse d'ions

Le super-complexe est un objet fragile qui peut être dissocié par un excès de détergent. La solubilisation est une étape importante, au cours de laquelle les protéines se trouvent en présence d'une forte concentration de détergent. Cependant ce qui est déterminant n'est pas la concentration en détergent, mais le ratio détergent:lipides. Durant la solubilisation, une forte concentration en détergent est nécessaire car la quantité de lipides est très importante. Or dans les étapes suivantes, notamment après l'ultracentrifugation permettant la séparation des membranes et des protéines solubilisées, la quantité de lipides diminue fortement, entraînant une augmentation significative du ratio détergent:lipide et une possible déstabilisation de la protéine.

Lors de la purification du super-complexe, les membranes solubilisées sont déposées sur un gradient de saccharose contenant une faible concentration de détergent (0,4 mM de β -DDM). Cependant il faut un temps assez long aux protéines pour réellement entrer dans le gradient, et les micelles vont elles aussi migrer à travers le gradient, même si leur migration est censée être plus lente que celle du super-complexe. Les protéines se trouvent dans des conditions déstabilisantes pendant plusieurs heures après leur solubilisation. Pour éviter cela, l'étape de chromatographie sur la colonne Q ceramic est placée immédiatement après la solubilisation afin d'éliminer l'excès de lipides et de détergents.

Protocole : Le surnageant de solubilisation est injecté sur une colonne échangeuse d'anions de type Q ceramic. Pour cela, il a été nécessaire de préparer une colonne avec un volume de résine plus important. En effet, *G. stearothermophilus* possède de nombreux lipides chargés négativement qui se lient à la colonne et entraînent une saturation rapide de la colonne de 20 ml. Afin de purifier 25 ml de membranes à 25 mg/ml (625 mg de protéines), il a été nécessaire de préparer une colonne contenant la même résine Q ceramic mais d'un volume de 100 ml.

Le but de cette étape n'est pas de purifier l'échantillon mais d'éliminer l'excès de détergent et de lipides. Le super-complexe est élué à 200 mM de NaCl (cf. figure III.14). Une élution rapide (1 CV) entraîne l'apparition d'un pic à 420 nm contenant le super-complexe mais également de nombreux autres contaminants, qui est récupéré puis déposé sur le gradient de saccharose.

Conclusion : La colonne de Q ceramic est placée après la solubilisation des membranes et avant le gradient de saccharose dans le protocole. Il est ainsi possible de charger sur le gradient un échantillon débarrassé en partie de l'excès de détergent et de lipides résultant de la solubilisation, et déjà enrichi, entraînant une légère amélioration de la séparation sur gradient de saccharose, ainsi que la disparition de la bande supérieure du gradient. Cette bande colorée correspond probablement à certaines protéines qui ne se fixent pas à la colonne de Q ceramic, ce n'est donc pas une autre espèce du super-complexe. Cette modification du protocole n'a pas un effet important sur le niveau de pureté de l'échantillon, mais permet de limiter les risques de

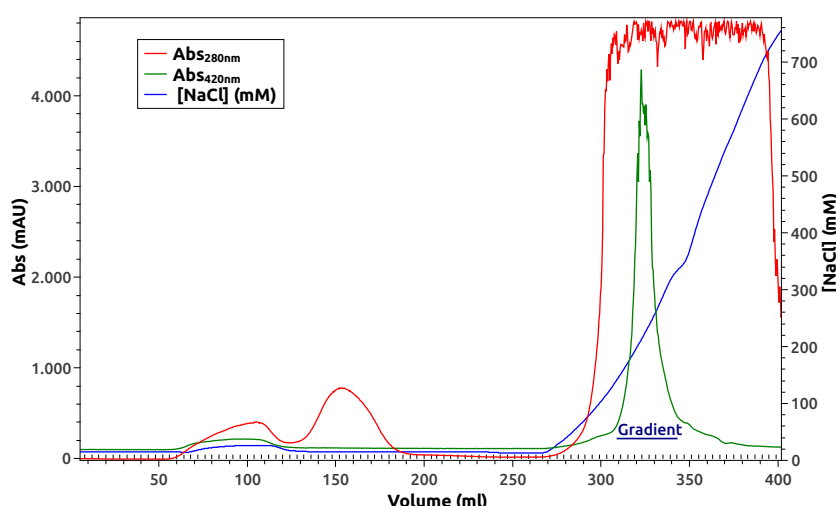


FIGURE III.14 – **Élimination de l'excès de lipides et détergent.** Profil d'élution de 25 ml de membranes solubilisées en β -DDM sur la colonne Q ceramic de 100 ml. Les fractions déposées sur le gradient sont indiquées en bleu marine. Tampons utilisés : A_{1,D} et B_{1,D} (cf. tableau II.3).

délipidation.

Quel(s) détergent(s) utiliser pour la purification ?

Dans le cas d'un super-complexe, l'assemblage supra-moléculaire étant fragile, le détergent peut séparer les différents partenaires, ou changer la stœchiométrie d'association entre les complexes. Nous ne disposons pas vraiment de moyen de contrôler la stœchiométrie et l'état oligomérique du super-complexe. De plus, nous n'avons pas eu le temps de mettre en place un suivi des lipides durant la purification, qui nous aurait permis de suivre la délipidation de l'échantillon. Le β -DDM et la FC₁₄ sont des détergents permettant la solubilisation et le maintien en solution du super-complexe. Bien que le C₁₂E₈ ne soit pas un bon candidat pour la solubilisation des membranes, nous avons essayé de travailler en C₁₂E₈, en effectuant un échange de détergent après la solubilisation, mais ce détergent ne permet pas un bon maintien des protéines en solution. Il a été difficile de choisir entre les deux principaux détergents utilisés : le β -DDM et la FC₁₄. Nous nous sommes tournés dans un premier temps vers la FC₁₄ avant de revenir vers le β -DDM.

1. Échange de détergent vers le C₁₂E₈

Protocole 5 : Q ceramic - gradient de saccharose - Mono Q - Mono Q

Le polyoxyéthylène C₁₂E₈ n'a pas permis la solubilisation des membranes de *G. stearothermophilus* dans nos conditions expérimentales. Pourtant, ce détergent nous semble être un candidat intéressant pour manipuler le super-complexe, car il a permis la cristallisation de certains gros complexes membranaires, tels que la pompe à calcium du réticulum sarcoplasmique (SERCA). Dans ce cas, les cristaux sont formés grâce à des contacts au niveau des parties membranaires, médiés par le détergent, entraînant la formation du cristal par empilement de membranes (Toyo-

shima *et al.*, 2000). Le super-complexe ayant une forme de disque, on s'attend à avoir plus de surfaces hydrophobes transmembranaires que de parties solubles, ce qui peut rendre délicate la formation de cristaux.

Le détergent utilisé pour la solubilisation des membranes peut être par la suite échangé contre un autre détergent à différentes étapes de la purification. Nous avons substitué le β -DDM et la FC₁₄ utilisés pour la solubilisation par le C₁₂E₈, selon différents protocoles, puis purifié le super-complexe en C₁₂E₈.

Protocole : Il est possible de changer de détergent à différentes étapes de la purification. Nous avons testé :

- l'échange sur le gradient de saccharose : les protéines solubilisées en β -DDM ou FC₁₄ sont déposées sur un gradient de saccharose 10%-30% de 10 ml contenant 0,4 mM de C₁₂E₈, puis centrifugées. La bande basse, contenant le super-complexe est prélevée puis injectée sur une colonne échangeuse d'ions htq 5ml, et purifiée à l'aide des tampons A_{1,C} et B_{1,C}.
- l'échange de détergent sur colonne : la bande basse du gradient de saccharose, en β -DDM ou FC₁₄, est prélevée puis injectée sur une colonne échangeuse d'ions de type htq 5ml, équilibrée en tampon A_{1,D} ou A_{1,F}. L'échantillon est lavé avec 2 CV de ce même tampon, puis par 5 CV de tampon A_{1,C}, contenant 0,4 mM de C₁₂E₈. L'élution se fait avec le tampon B_{1,C} contenant également 0,4 mM de C₁₂E₈.

La première option semblant être plus "douce" pour la protéine, a été majoritairement utilisée. En effet, l'échange se fait progressivement durant la migration du super-complexe dans le gradient, et si quelques molécules de β -DDM ou de FC₁₄ restent associées au super-complexe, elles seront remplacées par des molécules de C₁₂E₈ dans les étapes suivantes de chromatographie.

La figure III.15 présente le profil d'élution du super-complexe en C₁₂E₈ sur une colonne échangeuse d'ions. Le pic à 200 mM présent sur les profils d'élution en β -DDM et FC₁₄ est remplacé par un pic éluant autour de 400 mM de NaCl, contenant le super-complexe, d'après la migration sur gel SDS-PAGE. Ce pic peut, selon les purifications, coexister avec un pic à 200 mM. La compréhension de l'état et de l'origine de ces différents pics (200, 300 et 400 mM de NaCl) nous a pris du temps. En effet, si pour cette purification le gel montre clairement que les deux pics n'ont pas le même contenu en sous-unités, les premières expériences réalisées contenaient plus de pics, avec notamment des superpositions des pics à 200 mM et 300 mM de NaCl.

Nous avons d'abord tenté de cristalliser séparément chacun des pics, en pensant que chacun représentait une population différente de super-complexe. Des cristaux ont été rapidement obtenus à partir du pic à 300 mM, ce qui nous a encouragé à continuer avec le C₁₂E₈. Ces cristaux ont diffracté à faible résolution (7 Å), mais leur contenu en atomes lourds (fer des hèmes)

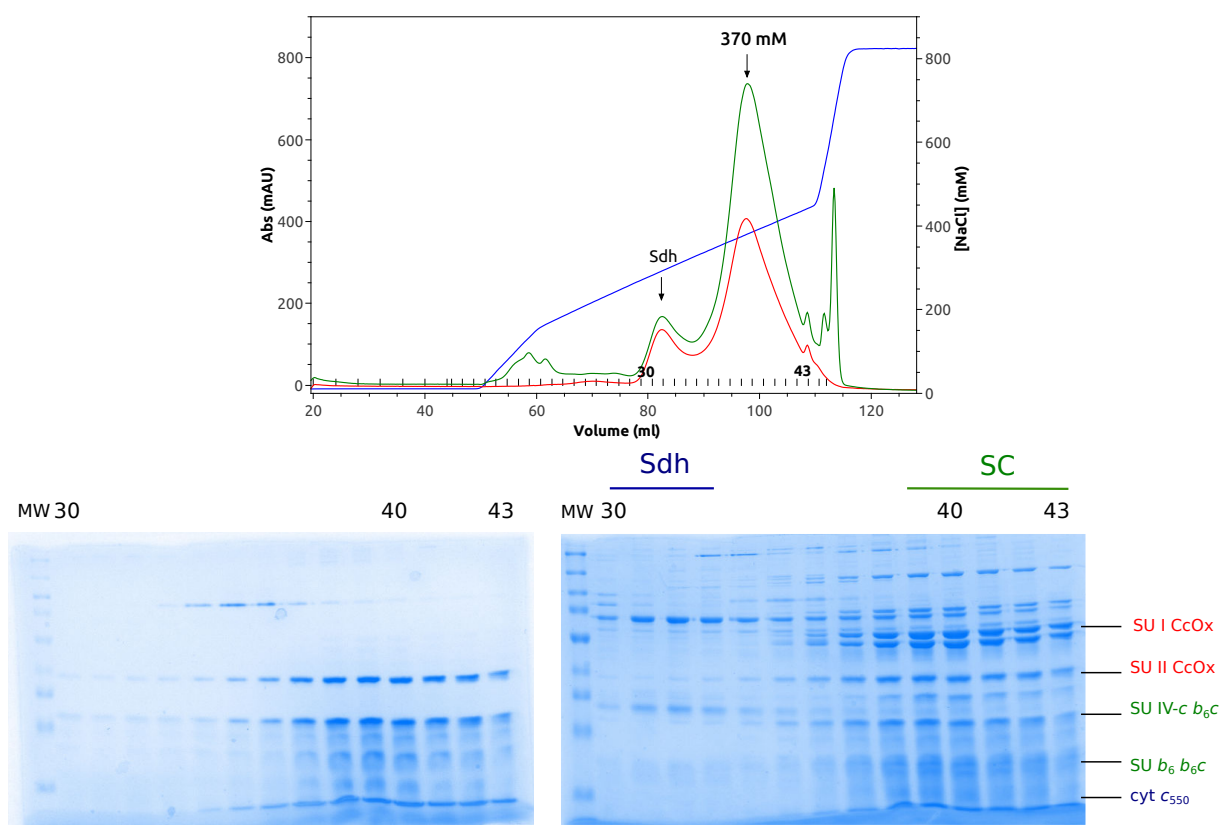


FIGURE III.15 – **Purification du super-complexe en $C_{12}E_8$.** Haut : Profil d'élution sur colonne Q ceramic de 20 ml de la bande basse du gradient de saccharose à 0,4 mM de $C_{12}E_8$. Tampons utilisés : $A_{1,C}$ et $B_{1,C}$ (cf. tableau II.3). Bas : Gel SDS-PAGE des fractions purifiées. Gauche : coloration au TMBZ; droite : coloration au bleu de Coomassie.

a permis d'obtenir la phase et une carte de densité électronique. Le complexe Sdh (succinate déhydrogénase) a pu être identifié par remplacement moléculaire. À partir de ce moment, nous avons associé le pic à 300 mM de NaCl à ce complexe protéique, rendant nos profils d'élutions plus compréhensibles. Voir annexes A.1.

Le ratio entre les pics à 200 mM et 400 mM est assez fluctuant d'une purification à l'autre. Une ultracentrifugation des fractions du pic à 400 mM dans les conditions utilisées en début de purification pour séparer les protéines solubilisées des membranes entraîne l'apparition d'un culot brun, correspondant au super-complexe agrégé. Dans nos conditions expérimentales, ce détergent ne permet pas un bon maintien en solution du super-complexe.

Conclusion : La purification en $C_{12}E_8$ entraîne l'élution (inconstante) du super-complexe sur colonne échangeuse d'ions en un pic à 400 mM de NaCl, correspondant au super-complexe agrégé. Cette purification a permis d'obtenir des cristaux et d'identifier le pic éluant à 300 mM de NaCl comme correspondant à la Sdh. L'obtention de ces cristaux nous a quelque peu induit en erreur et poussé à multiplier les tentatives de purification en $C_{12}E_8$. Il est assez inattendu que le $C_{12}E_8$ ne permette pas le maintien en solution du super-complexe. Il pourrait être possible

de trouver des conditions permettant d'utiliser ce détergent, probablement en augmentant la concentration. Pourtant, en travaillant à 0,4 mM nous sommes déjà à 0,3 mM au-dessus de la cmc.

2. Quel détergent utiliser ?

Protocole 6 : gradient de saccharose - htq 5ml - Aca 22

Le β -DDM et la FC₁₄ sont deux détergents permettant la solubilisation et la purification du super-complexe. L'expérience présentée ci-dessous a pour but de choisir un de ces deux détergents.

Protocole : Deux purifications identiques sont comparées : une en β -DDM et l'autre en FC₁₄. Les membranes sont solubilisées en 15 mM de β -DDM ou 10 mM de FC₁₄ pendant 45 minutes à température ambiante. Les membranes solubilisées sont isolées par ultracentrifugation, puis séparées par une étape de gradient de saccharose. La bande basse du gradient est injectée sur une colonne échangeuse d'ions (htq 5ml) préalablement équilibrée avec le tampon A_{1,D} ou A_{1,F}, puis le super-complexe est élué par un gradient de tampon B_{1,D} ou B_{1,F} (cf. table II.3). Le pic contenant le super-complexe est concentré puis chargé sur une colonne de tamis moléculaire Aca 22 (tampons C_{1,D} ou C_{1,F}). Les fractions d'élution sont analysées par SDS-PAGE, pour observer la composition en sous-unités, et BN-PAGE pour évaluer l'état oligomérique (cf. figure III.16).

Le pic d'élution du super-complexe en β -DDM est décalé de 0,63 ml par rapport à celui en FC₁₄, suggérant un objet de poids moléculaire plus important. Cette observation est confirmée par la migration sur gel natif CN-PAGE : différentes bandes, de différents poids moléculaires sont observables à la fois en β -DDM et en FC₁₄, mais les ratios entre les bandes ne sont pas les mêmes dans les deux détergents. D'après le gel SDS-PAGE, ainsi que des comparaisons avec le super-complexe de *C. glutamicum* (Richers S, 2008), les deux bandes indiquées par une flèche rouge correspondent au super-complexe. En FC₁₄ la population de super-complexe semble beaucoup plus homogène, avec une bande majoritaire migrant à proximité du marqueur moléculaire de 480 kDa, alors qu'en β -DDM, le super-complexe est séparé entre deux populations de poids moléculaire différents, pouvant correspondre à différents états oligomériques du super-complexe. L'estimation des poids moléculaires à partir de la migration sur gel natif est très approximative.

Conclusion : À partir de cette expérience, nous avons choisi de travailler en FC₁₄, pour plusieurs raisons :

1. L'observation du gel natif montre un échantillon plus homogène dans le cas d'un super-complexe isolé en FC₁₄, alors qu'en β -DDM plusieurs populations coexistent en quantités non négligeables. Or pour la cristallisation il est important d'obtenir un échantillon homogène.
2. Nos purifications en FC₁₄ présentent généralement des profils d'élution sur colonne échangeuse d'ions bien plus simples que les échantillons en β -DDM, dont les profils sont

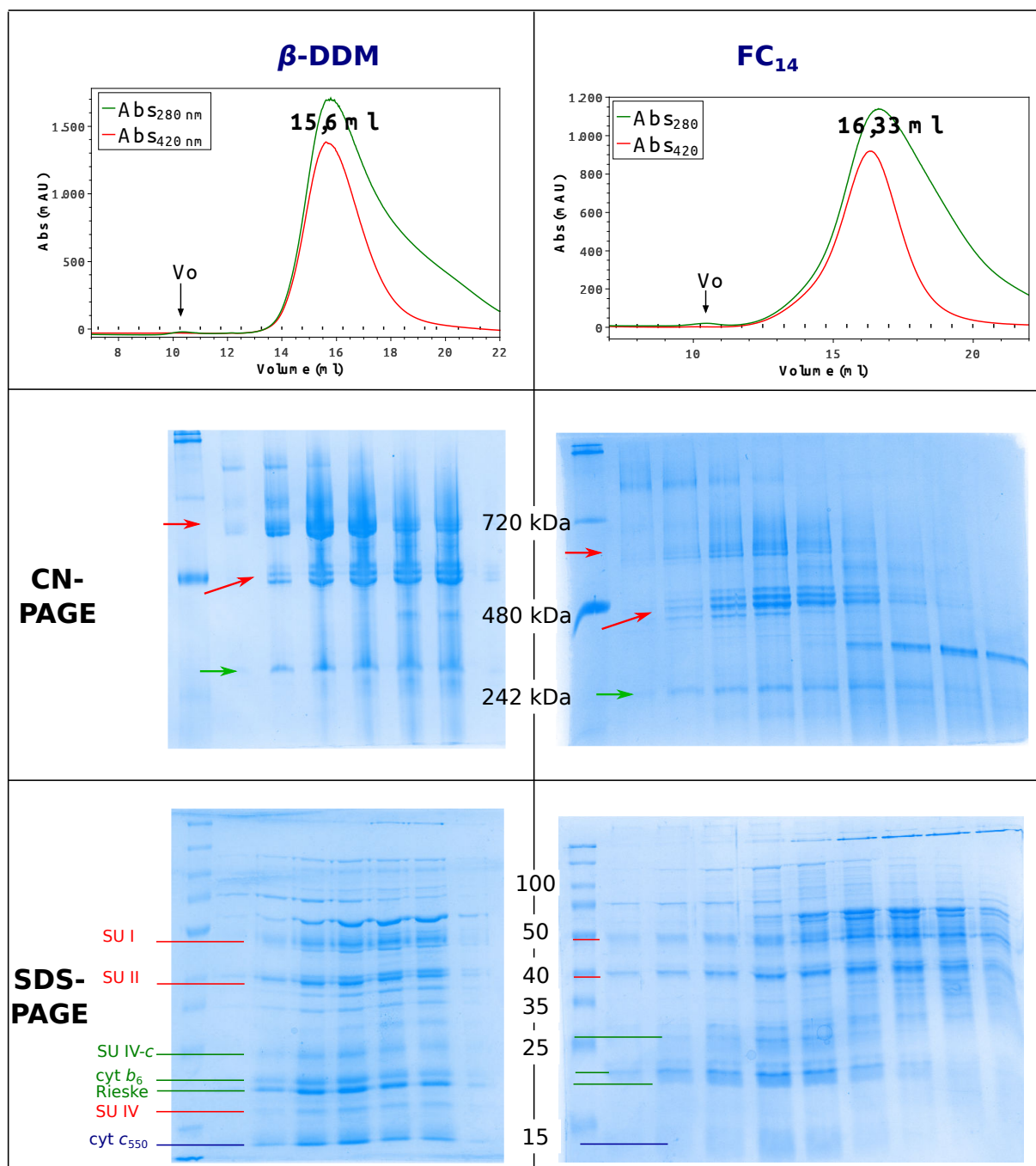


FIGURE III.16 – **Comparaison de purifications en β -DDM et en FC_{14} .** Profil d'élution du super-complexe purifié en β -DDM ou FC_{14} sur la colonne de tamis moléculaire Aca22, les fractions sont analysées par migration sur gels natifs et gels SDS. Les **flèches rouges** du gel natif représentent les hypothétiques différentes populations de super-complexe, les **flèches vertes**, une bande qui pourrait provenir de la dissociation des assemblages supra-moléculaires durant la migration. Sur le gel SDS, les sous-unités de la **CcOx *caa3*** sont indiquées en rouge et celles du **cytochrome *b6c*** en vert. Tampons utilisés : $\text{C}_{1,D}$ et $\text{C}_{1,F}$ (cf. tableau II.3).

beaucoup plus fluctuants.

Avec le recul, le choix de la FC₁₄ n'était pas forcément un très bon choix, car à cette étape de ce travail de thèse nous n'avons pas pris en compte l'aspect oligomérique du super-complexe, cette question est réapparue par la suite. Cependant, la comparaison des purifications avec ces deux détergents nous a permis de comprendre certaines choses sur le super-complexe, qui seront discutées dans la partie IV.2.2.

Après avoir observé le phénomène de dissociation du super-complexe (cf. III.2.2), nous avons progressivement abandonné la FC₁₄. Pourtant, il est possible de travailler avec ce détergent, en étant attentif aux concentrations. Il a notamment été utilisé au cours de ce travail de thèse pour les études spectroscopiques et de titration des cofacteurs redox.

3. Échange de détergent sur colonne

Protocole 7 : gradient de saccharose - htq 5ml - htq 5ml

L'expérience décrite figure III.16 a mené au choix de la FC₁₄, permettant d'obtenir une population plus homogène de super-complexe. Cependant ce détergent n'a quasiment pas été utilisé pour la résolution de structures de protéines membranaires, probablement en raison de son action déstabilisante. Les membranes sont donc solubilisées en 10 mM de FC₁₄, puis nous cherchons à repasser en β -DDM au cours de la purification en effectuant un échange de détergent sur colonne échangeuse d'ions.

Protocole : Les membranes sont solubilisées avec 10 mM FC₁₄ pendant 45 min à température ambiante. Le surnageant d'ultracentrifugation, contenant les protéines solubilisées, est soumis à une ultracentrifugation sur gradient de saccharose contenant 0,4 mM de FC₁₄. La bande basse de ce gradient est injectée sur une colonne htq 5ml et éluée avec des tampons contenant de la FC₁₄ (A_{1,F}, B_{1,F}). Le pic contenant le super-complexe est déssalé par dialyse, puis réinjecté sur la colonne htq 5ml. La colonne est lavée par 2 CV de tampon A_{1,F}, suivis de 5 CV de tampon A_{1,D}, contenant du β -DDM. L'échantillon est élué par un gradient de tampon B_{1,D}.

La figure III.17 présente les profils d'élution des deux colonnes échangeuses d'ions. Si lors de la première étape de chromatographie en FC₁₄, le super-complexe est élué en un pic composite à 200 mM de NaCl, lors de la seconde colonne, le profil d'élution montre deux pics distincts, identifiés comme étant le cytochrome *b₆c* et la CcOx *caa₃*, d'après la migration sur gel SDS. Cette expérience, répétée plusieurs fois, a toujours mené à la dissociation du super-complexe. Pour prévenir ce phénomène, 100 μ l de β -DDM à 1 mM sont injectés juste avant le passage du tampon en β -DDM, mais n'empêchent pas la dissociation.

Conclusion : Nous ne comprenons pas bien les facteurs qui gouvernent la dissociation du super-complexe, mais il semble qu'il peut être dissocié de plusieurs façons :

- par une trop forte concentration de détergent, comme figure III.11 où la solubilisation a

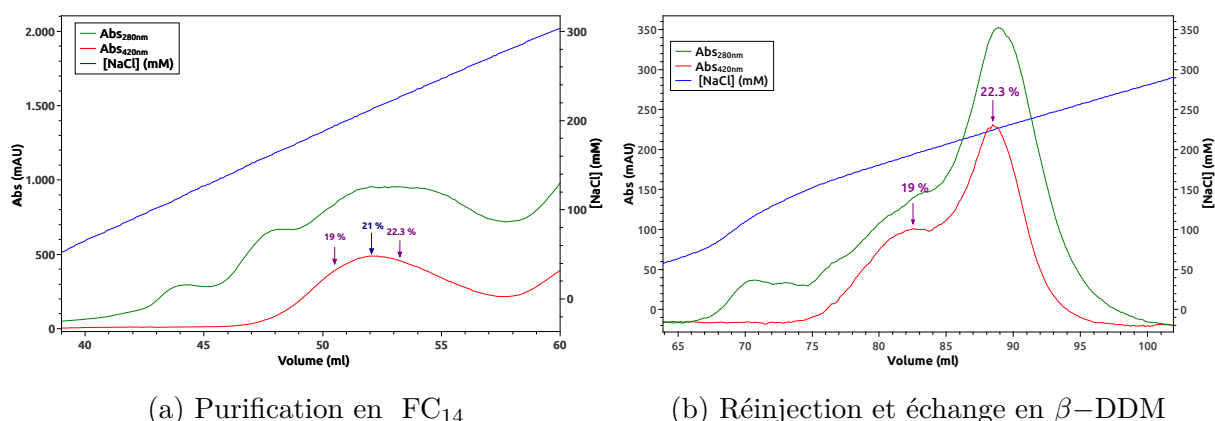


FIGURE III.17 – **Échange de détergent sur colonne échangeuse d'anions.** Les deux graphes sont "normalisés" sur la même pente du gradient de sel. (a) : Injection de la bande basse du gradient de saccharose sur colonne htq 5ml (tampons : $A_{1,F}$ et $B_{1,F}$). (b) : Réinjection après dialyse du pic à 210 mM sur la même colonne, avec échange vers le β -DDM (tampons : $A_{1,F}$, $A_{1,D}$ et $B_{1,D}$, cf. tableau II.3).

- été effectuée à 30 mM de FC_{14} (contre 10 mM habituellement)
- dans le cas d'un échange de détergent sur colonne (de la FC_{14} au β -DDM).

Il est probablement possible de casser le super-complexe de nombreuses autres manières, le phénomène de délipidation jouant certainement un rôle majeur.

La purification semble plus simple en FC_{14} avec un objet plus homogène sur tamis moléculaire, mais le fait que ce détergent puisse dissocier le super-complexe n'en fait pas un très bon candidat pour une étude structurale. Enfin, l'échange de détergent étant un peu compliqué, nous essayons de commencer la purification directement en β -DDM et de ne pas utiliser la FC_{14} .

4. Faut-il abaisser la concentration de détergent en cours de purification ?

Protocole 8 : Q ceramic - gradient de saccharose - Mono Q - Mono Q

Le cytochrome b_6f , homologue du cytochrome b_6c , est fragile et se dissocie facilement, même avec une faible concentration de 0,4 mM DDM. Pendant sa purification, la concentration de détergent est progressivement diminuée, jusqu'à la limite de la cmc (0,2 mM pour une cmc de 0,18 mM). La connaissance biochimique du cytochrome b_6f peut être utilisée pour mettre en place le protocole de purification du super-complexe, qui contient un cytochrome b_6c .

Protocole : Toute la purification est effectuée en 20 mM MOPS pH 7, compatible avec l'utilisation de la colonne de tamis moléculaire Tsk G4000sw. Les membranes solubilisées en β -DDM sont injectées sur une colonne échangeuse d'ions de type Q ceramic de 100 ml (tampons $A_{2,D}$ et $B_{2,D}$ contenant 0,4 mM de β -DDM). Le pic contenant le super-complexe est soumis à une ultracentrifugation sur gradient de saccharose à 0,4 mM de β -DDM, puis la bande du gradient contenant le super complexe est purifiée sur une colonne Mono Q, avec les mêmes tampons $A_{2,D}$

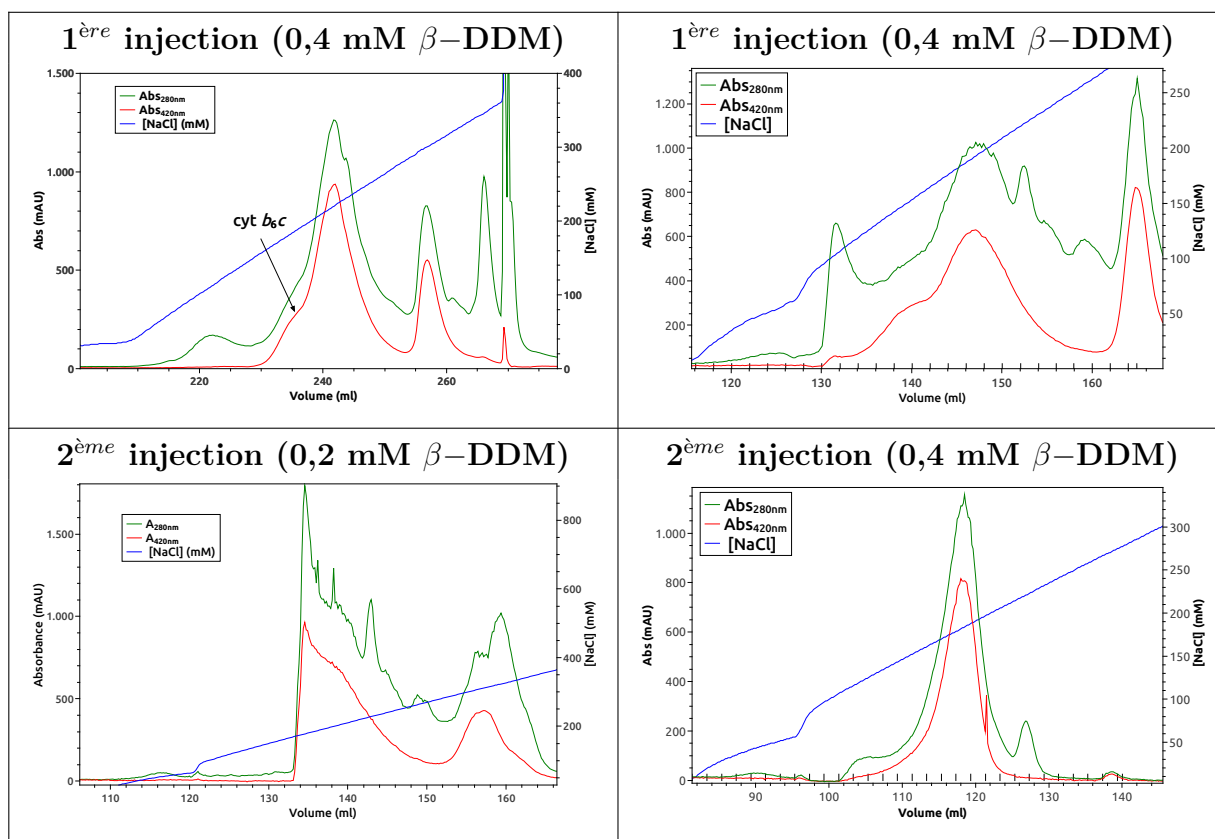


TABLE III.3 – **Diminution de la concentration en détergent de l'échantillon.** Profils d'élution sur colonne Mono Q 10/100GL (**Haut**) : première injection à 0,4 mM de β -DDM. Tampons utilisés : $A_{2,D}$ et $B_{2,D}$ (**Bas**) : seconde injection à 0,2 mM ou 0,4 mM de β -DDM. Tampons utilisés : $A_{2,D-}$ et $B_{2,D-}$ ou $A_{2,D}$ et $B_{2,D}$ (cf. tableau II.3).

et $B_{2,D}$. Le pic à 200 mM est dessalé par dialyse puis repurifié sur la colonne Mono Q, mais en utilisant les tampons $A_{2,D-}$ et $B_{2,D-}$, qui contiennent 0,2 mM de β -DDM.

Le profil d'élution du super-complexe dans un tampon à 0,2 mM de β -DDM est étrange, avec l'apparition d'un pic asymétrique (cf. table III.3). Les absorptions à 420 nm et 280 nm augmentent subitement, puis le pic "traîne". C'est un profil qui n'a pas été visualisé au préalable. Le passage de ce pic sur une colonne de tamis moléculaire entraîne l'élution du super-complexe en un pic à 17,4 ml, comme pour la purification à 0,4 mM de β -DDM, mais en perdant 40% du signal.

Conclusion : La diminution de la concentration en détergent entraîne une agrégation du super-complexe, probablement due à un changement trop brutal du ratio lipide:détergent. Une diminution progressive serait préférable, et devra être étudiée à l'avenir.

Conclusion détergents : L'étude du super-complexe a été commencée en β -DDM. Après un détour par la FC_{14} et le $C_{12}E_8$, nous sommes revenus au β -DDM, qui permet l'isolement d'un super-complexe plus stable. Ce retour au β -DDM n'est peut être pas définitif, de nouveaux

détergents pourront être testés dans un futur proche. Il reste de nombreux paramètres que ne nous maîtrisons pas au niveau de l'utilisation des détergents, tels que :

- pourquoi le $C_{12}E_8$ ne permet pas de maintenir le super-complexe en solution ?
- pourquoi l'échange de détergent mène à une dissociation de l'échantillon ?

Ajout d'une étape de chromatographie d'exclusion de taille

Protocole 9 : Q ceramic - gradient de saccharose - Mono Q - Mono Q - gel filtration

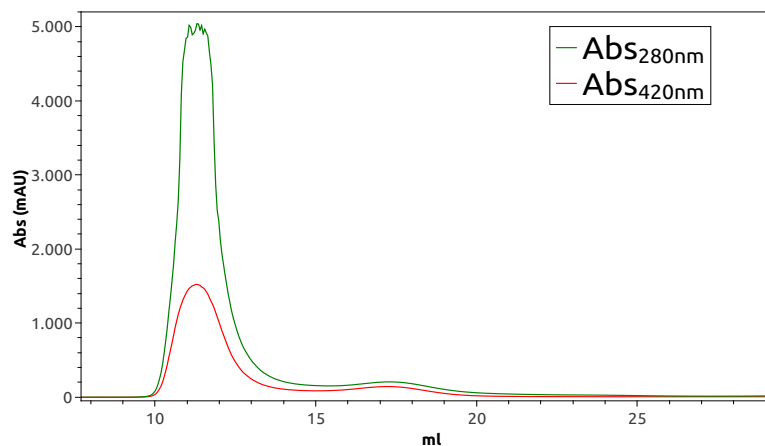
Dans de nombreux protocoles de purification en vue d'études structurales, la dernière étape est une chromatographie d'exclusion de taille (ou gel filtration), qui permet à la fois la séparation de certains contaminants, mais également une vérification de l'état de la protéine (dissociation, agrégation). Enfin, cette étape peut aussi être l'occasion de changer de tampon, par exemple en diminuant une concentration en sel ou en détergent.

Protocole : À la fin de la purification, l'échantillon est passé sur une colonne de gel filtration. Plusieurs colonnes ont été utilisées : la Superdex 200 sépare des protéines jusqu'à 600 kDa. La colonne Aca 22, préparée au laboratoire, a une résolution de 100 kDa à 1,2 MDa, mais est contraignante à utiliser (la limite de pression très basse impose des débits très lents, et l'équilibration et le passage de l'échantillon sur cette colonne nécessitent un temps important). La colonne Tsk G4000sw est une colonne plus adaptée aux objets de poids moléculaire important, qui a été utilisée plus tardivement durant ce travail.

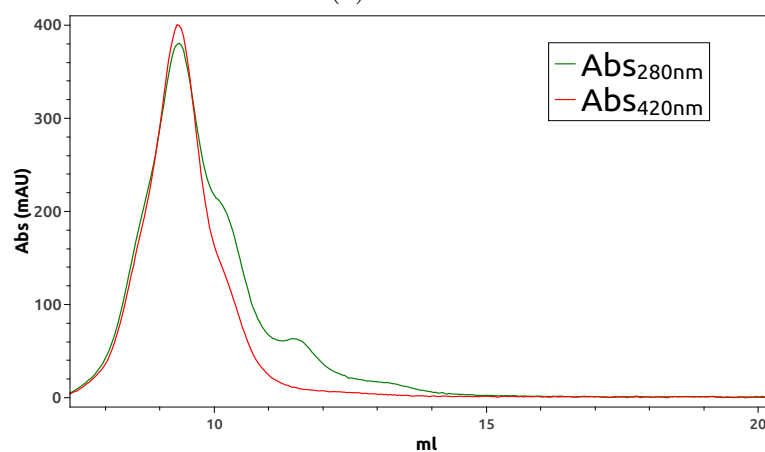
Le passage en TSK G4000sw nécessite un changement du pH du tampon, car la colonne possède une matrice de silicate. Le tampon Tris pH 8 est donc remplacé par du MOPS à pH 7.

La figure III.18 compare l'élution d'un échantillon de super-complexe sur les trois colonnes de tamis moléculaires utilisées. L'axe des x commence à V_o et fini à V_t pour chaque chromatogramme. Les colonnes Aca 22 et Tsk G4000sw semblent permettre une meilleure séparation de l'échantillon de super-complexe que la colonne superdex 200, qui est moins adaptée pour les haut poids moléculaires. La colonne Aca 22 a été assez peu utilisée pour des raisons techniques. La colonne Tsk G4000sw a été disponible tardivement lors de cette étude, et une grande partie des purifications ont été réalisées avec la superdex 200.

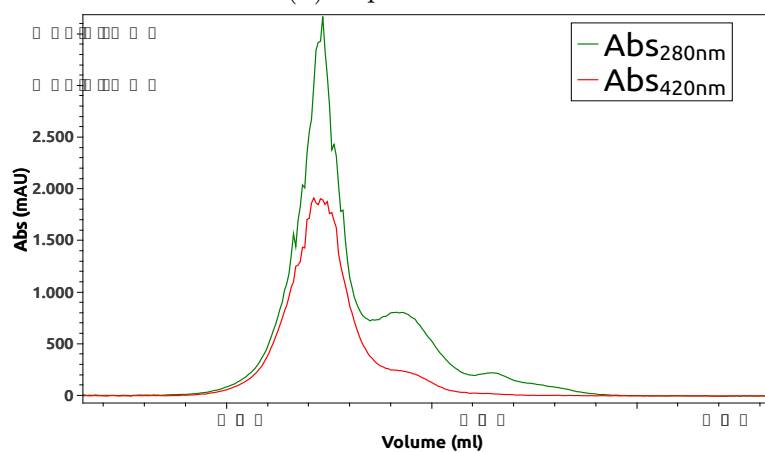
Conclusion : L'élution de l'échantillon sur une colonne de tamis moléculaire permet la séparation de contaminants de plus faible poids moléculaire du super-complexe, ainsi que du cytochrome b_6c isolé. Cette dernière étape de chromatographie est une étape importante de purification.



(a) Aca 22



(b) Superdex 200



(c) Tsk G4000sw

FIGURE III.18 – Chromatogrammes d'élution du super-complexe sur différentes colonnes de tamis moléculaire. Pour chaque chromatogramme, l'échelle des x commence à V_o et fini à V_t . Tampons de purification : $C_{1,D}$ pour (a) et (b), $C_{2,D}$ pour (c).

Protocole actuel de purification du super-complexe

Protocole : Q ceramic - gradient de saccharose - Mono Q - Mono Q - Tsk G4000sw

Les différents résultats obtenus après les essais de nombreuses conditions ont mené à l'élaboration d'un protocole de purification, permettant l'isolement d'un super-complexe stable. Cependant, ce protocole reste à valider par des techniques telles que la microscopie électronique, afin d'évaluer son homogénéité. La capacité de ce super-complexe purifié à former des cristaux sera également un critère fondamental pour faire évoluer le protocole.

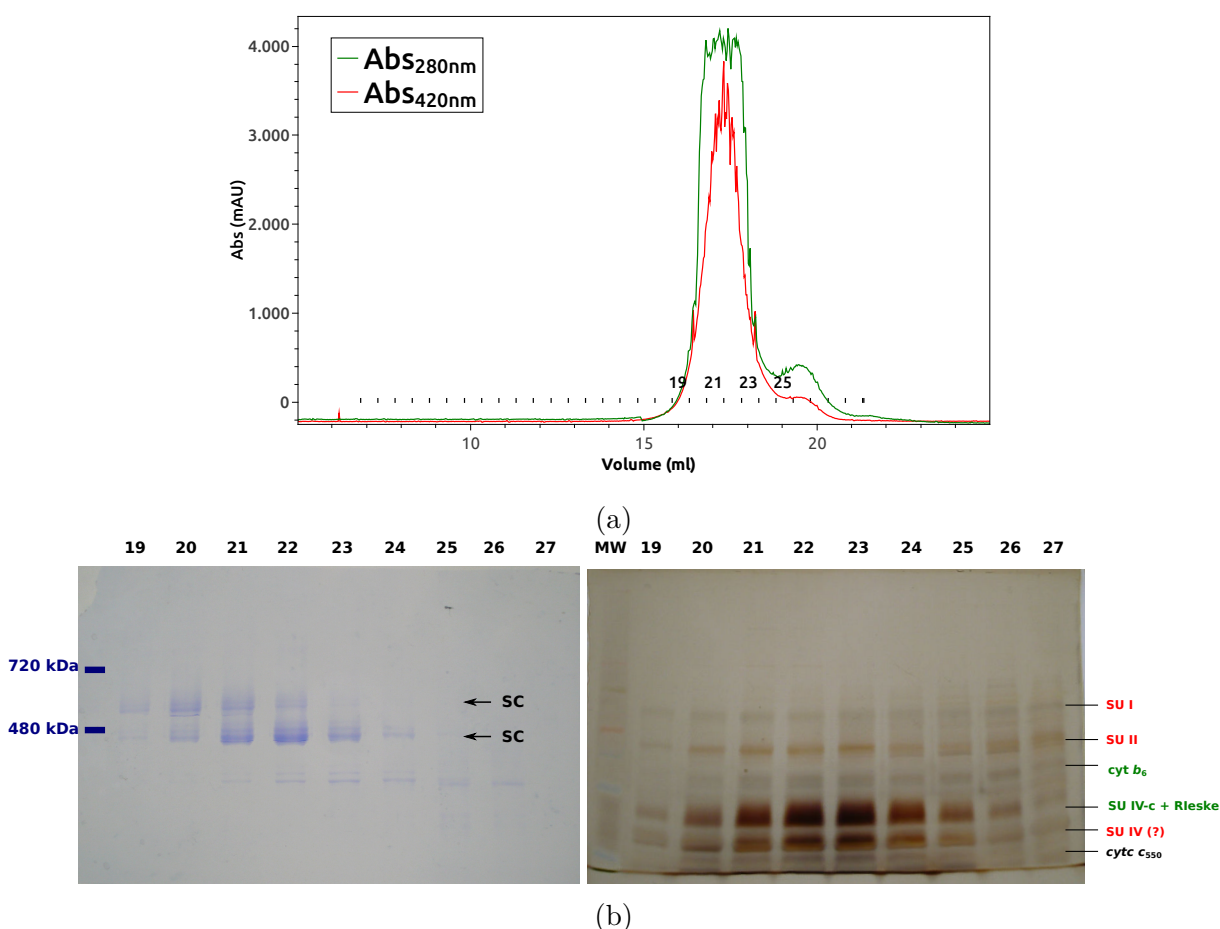


FIGURE III.19 – **Le super-complexe en fin de purification.** (a) : Profil d'élution sur colonne Tsk G4000sw d'un échantillon purifié de super-complexe (SC). (b) : Migration des fractions sur gels d'acrylamide. Gauche : gel natif coloré au bleu de Coomassie, Les marqueurs moléculaires sont indiqués en bleu foncé. Droite : gel en conditions dénaturantes coloré au nitrate d'argent. En rouge, les sous-unités de la CcOx *caa3*, en vert celles du cytochrome *b₆c*.

La protéine est purifiée intégralement en β -DDM, à 0,4 mM, dans un tampon MOPS à pH 7, afin de permettre l'utilisation de la colonne de tamis moléculaire Tsk G4000sw. L'utilisation du tampon à pH 7 entraîne un léger décalage des pics d'élutions, vers des valeurs un peu plus faibles de NaCl : à pH 7, le super-complexe élue à 180 mM de NaCl.

25 ml de membranes à 25 mg/ml sont solubilisées avec 15 mM de β -DDM, dans un tampon

MOPS 20 mM pH 7 à température ambiante pendant 45 minutes. Une centrifugation à 40 000 rpm pendant 45 minutes permet de récupérer les membranes solubilisées, qui sont injectées sur une colonne échangeuse d'anions de type Q ceramic d'un volume de 100 ml, afin d'éliminer l'excédent de lipides et de détergent. Le pic d'élution à 180 mM de NaCl est déposé sur un gradient linéaire de saccharose 10%-30% de 50 ml, puis centrifugé à 22 000 rpm pendant environ 15 h. La bande colorée, contenant le super-complexe, est délicatement prélevée avec une seringue, puis injectée sur une colonne échangeuse d'ions de type Mono Q, qui permet une bonne résolution des pics grâce à une forte densité de groupes chargés dans la résine. L'échantillon est lavé avec le tampon A_{2,D}, puis élué en 20 CV de tampon B_{2,D}. Les fractions centrales du pic d'élution sont alors dialysées 45 min contre 1 L de tampon MOPS pH 7 à 20 mM. Le tampon de dialyse ne contient pas de détergent, car le β -DDM est un détergent à faible cmc, et son temps d'équilibration lors d'une dialyse est de plusieurs jours. L'échantillon dialysé est réinjecté une seconde fois sur la colonne Mono Q, puis élué avec un gradient plus long (25 CV) afin d'augmenter la résolution et de bien séparer le super complexe et le cytochrome *b₆c* isolé. Les fractions contenant le super-complexe sont ensuite concentrées à 100 μ l, puis injectées sur la colonne de tamis moléculaire Tsk G4000sw. La figure III.19 présente un profil d'élution d'un échantillon sur la colonne de gel filtration, ainsi que la migration des fractions sur gels SDS-PAGE et BN-PAGE.

Un litre de culture de *G. stearothermophilus* en fermenteur permet d'obtenir 10 g de cellules, à partir desquelles 250 mg de membranes sont isolées. La purification de ces membranes permet l'isolement de 400 μ g de super-complexe purifié.

Ce super-complexe est relativement stable, car son profil d'élution sur la colonne Tsk G4000sw reste inchangé après un cycle de congélation/décongélation, ou après une nuit à température ambiante. Le pic d'élution autour de 17 ml correspond au super-complexe purifié, et peut être utilisé par exemple pour des expériences de caractérisation, ou des essais de cristallisation.

Nous avons mis en place un protocole permettant d'isoler un super-complexe relativement pur, mais de nombreux paramètres restent incompris ou à optimiser. Par exemple, la question de l'homogénéité et de l'état oligomérique du super-complexe purifié sont des points fondamentaux, et pour l'instant non maîtrisés. Ces questions seront discutées par la suite.

III.2.4 Vers la cristallographie

Nous avons effectué des tests de cristallogenèse, avec des échantillons provenant de différents protocoles de purification. Avec les premiers protocoles, plusieurs pics de purification étaient obtenus, contenant des mélanges d'espèces, que nous n'étions pas en mesure d'identifier. Des essais de cristallisation effectués pour chaque pics nous ont tout de même permis d'obtenir des cristaux, avec le pic éluant à 300 mM de NaCl. La diffraction de ces cristaux à 7 Å de résolution et le remplacement moléculaire ont mené à l'identification de la Sdh (succinate déshydrogénase).

Les derniers essais de cristallisation en utilisant les protéines purifiées issues du dernier protocole de purification, n'ont à ce jour pas permis d'obtenir des cristaux. Pour plus d'informations sur la cristallisation, cf. annexe A.1.

III.3 Caractérisation du super-complexe purifié

Le protocole de purification mis en place durant cette thèse permet la purification de quantités correctes (400 μ g de super-complexe pour 1 L de culture) d'un objet contenant le cytochrome *b₆c* et la CcOx *caa₃*. Ce super-complexe, relativement stable dans nos conditions de purification, a été caractérisé par des techniques biochimiques et biophysiques.

L'étude de l'échantillon par électrophorèse, associée à la spectrométrie de masse a permis la détection de toutes les sous-unités supposées appartenir au super-complexe. La chromatographie d'exclusion de taille, la spectroscopie visible et la microscopie électronique ont été utilisées pour estimer la stœchiométrie et l'homogénéité de l'échantillon. Enfin, la spectroscopie RPE, les titrations redox et les expériences de photo-dissociation du CO ont permis d'avancer sur la caractérisation du super-complexe et de ses cofacteurs.

Nous avons utilisé d'autres données provenant de travaux sur des super-complexes différents, comme le super-complexe de *Bacillus sp. PS3* ou celui de *C. glutamicum* pour comparer nos résultats.

III.3.1 Composition en sous-unités du super-complexe

L'analyse de la composition en protéine du super-complexe a été effectuée par migration sur gel SDS-PAGE (cf. figure III.20) et par spectrométrie de masse, à la fois sur des échantillons en solution (cf. table III.4) et sur des bandes de gel SDS-PAGE. Le génome de *G. stearothermophilus* n'étant pas séquencé intégralement ni annoté, la recherche des séquences se fait à partir des génomes de *Geobacillus kaustophilus*, *Bacillus sp. PS3* et de *Bacillus subtilis*, ce qui peut expliquer la difficulté de détecter certaines sous-unités, ou les faibles scores obtenus. De plus, certaines sous-unités sont petites et très hydrophobes, et possèdent peu de sites de clivage à la trypsine. Leur digestion génère alors peu de peptides et elles sont difficiles à identifier en spectrométrie de masse, c'est par exemple le cas de la SU IV de la CcOx (CtaF).

Au début de cette étude, nous ne savions pas précisément quelles étaient les protéines impliquées dans le super-complexe. D'après Sone *et al.* (1987), il est composé du cytochrome *b₆c* et de la CcOx *caa₃*, nous avons déterminé qu'il contenait aussi le cytochrome *c₅₅₀*, d'après analyse de la bande de gel par spectrométrie de masse.

Le tableau III.4 récapitule certains résultats obtenus par Orbitrap sur un échantillon en

Rang	Acc	Description	PSM	Peptides
1	V6VB19	Multidrug transporter AcrB <i>Geobacillus</i> sp. <i>MAS1</i>	28	25
2	Q5L113	Cytochrome c oxidase subunit 2 <i>G.</i> <i>kaustophilus</i>	17	12
3	G5EBC7	Leucine dehydrogenase <i>G. kaustophilus</i>	17	14
4	Q5L3T1	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH <i>G. kaustophilus</i>	15	12
5	Q03438	Cytochrome c oxidase subunit 2 <i>Bacillus</i> sp. <i>PS3</i>	14	10
6	Q5KWH9	Succinate dehydrogenase (Flavoprotein subunit) <i>G. kaustophilus</i>	13	11
7	Q5KXY3	Penicillin-binding protein 1A/1B <i>G.</i> <i>kaustophilus</i>	10	10
8	Q5KXW0	Menaquinol-cytochrome c reductase cytochrome b (qcrB) <i>G. kaustophilus</i>	10	6
~				
12	P16262	Cytochrome c oxidase subunit 1 <i>Bacillus</i> sp. <i>PS3</i>	8	6
~				
19	Q5KXV9	Menaquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit (Rieske iron-sulfur protein) (qcrA) <i>G. kaustophilus</i>	7	6
~				
31	Q5KXW1	Menaquinol-cytochrome c reductase cytochrome b/c subunit (qcrC) <i>G.</i> <i>kaustophilus</i>	5	5
~				
65	Q5KX21	Cyt c oxidase SU IV <i>Geobacillus kaustophilus</i>	2	2
~				
68	Q5L111	Cyt c oxidase SU III <i>Geobacillus kaustophilus</i>	2	2

TABLE III.4 – Étude de la composition du super-complexe par spectrométrie de masse. L'échantillon est purifié selon le protocole 2 (gradient - Q ceramic - htq 5ml). Le super-complexe est alors concentré et injecté sur une colonne de tamis moléculaire superdex 200 (tampons : A_{1,D}, B_{1,D} et C_{1,D}). Le super-complexe purifié est digéré à la trypsine et analysé par MALDI-TOF. En vert : les sous-unités du cytochrome *b₆c*, en rouge, celles de la *CcOx caa₃*. Le PSM (= Peptide spectrum mass) correspond au nombre total de peptides détectés pour la protéine, "peptides" correspond au nombre de peptides uniques au sein du PSM. En spectrométrie de masse Orbitrap, 2 peptides est la limitation formelle de la présence d'une protéine.

phase liquide, en collaboration avec Chiara Guerrera (Plateau protéome Necker). Nous avons pu identifier toutes les sous-unités connues du super-complexe, sauf le cytochrome *c₅₅₀*, peut être en raison de la liaison covalente d'un hème *c*, qui modifie la masse des peptides et peut masquer des sites de coupure. De nombreuses autres protéines ont été détectées. L'Orbitrap est une

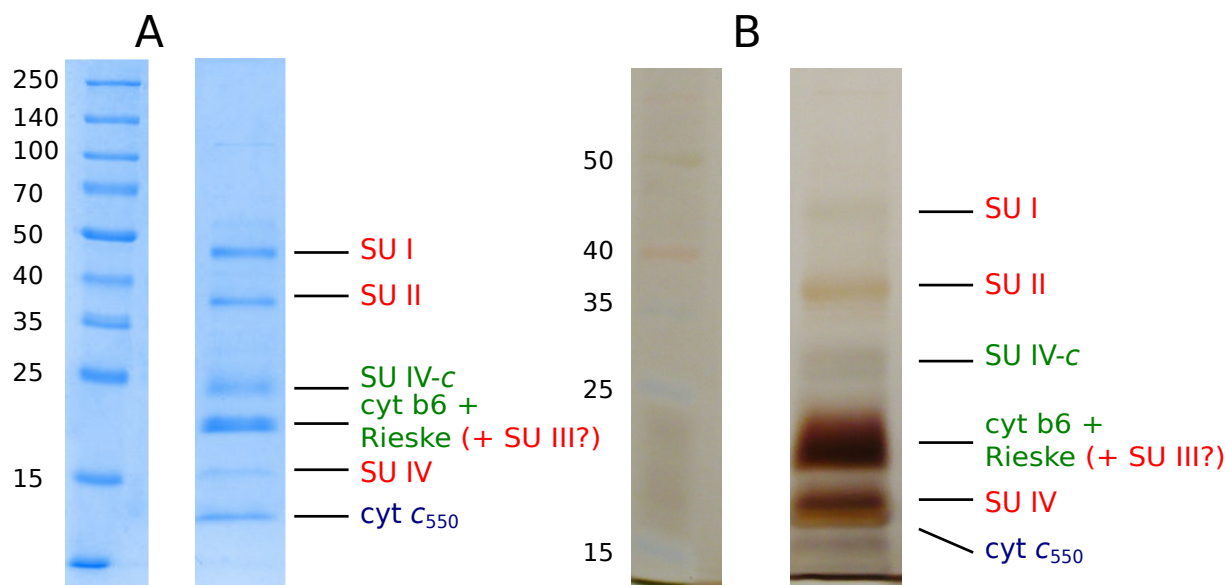


FIGURE III.20 – Gels SDS-PAGE du super-complexe purifié. Les échantillons sont issus de deux purifications selon le même protocole, décrit dans III.2.3. (A) : coloration au bleu de Coomassie, (B) : coloration au nitrate d'argent.

technique très sensible, mais non quantitative. L'objectif de cette analyse par spectrométrie de masse n'était pas de détecter tous les contaminants ou d'essayer d'identifier d'autres partenaires présents dans le super-complexe, mais plutôt de confirmer la présence de toutes les sous-unités attendues. Tous les polypeptides du cytochrome b_6c et de la CcOx caa_3 ont été détectés lors de cette analyse, ainsi que de nombreux polypeptides supplémentaires, notamment un transporteur ABC retrouvé à plusieurs reprises dans nos analyses.

La figure III.20 présente la migration du super-complexe purifié sur gel SDS-PAGE, résultant du protocole de purification décrit en III.2.3. Il est possible d'identifier toutes les sous-unités connues du super-complexe, d'après la littérature et les poids moléculaires calculés à partir des séquences. Certaines ont été confirmées par la spectrométrie de masse MALDI-TOF (sur gel) : les trois sous-unités du cytochrome b_6c (QcrA, QcrB, QcrC), et deux sous-unités de la CcOx caa_3 (CtaC, CtaD, correspondant aux SU I et SU II). La bande à 12 kDa a été attribuée au cytochrome c_{550} sur la base de sa coloration au TMBZ. Les sous-unités III et IV de l'oxydase sont positionnées de façon moins certaine sur le gel : la bande à 14 kDa est attribuée à la sous-unité IV, qui possède un poids moléculaire calculé de 12,3 kDa. La SU III a un poids moléculaire de 23,3 kDa, très proche de celui de la sous-unité b_6 , et peut se retrouver "cachée" sous cette bande.

Dans notre échantillon purifié, il ne semble pas y avoir de composants additionnels, contrairement à d'autres super-complexes, comme celui de *C. glutamicum* (cf. gel dans la table IV.1). La question de la CcOx bo_3 a été posée au début du projet par l'expression de ce complexe en conditions de faible aération du milieu (cf. III.1). Cette dernière n'a jamais été détectée dans les échantillons purifiés. Les deux sous-unités ayant des poids moléculaires de 61 kDa et 17 kDa,

pourraient co-migrer sur gel SDS-PAGE avec d'autres sous-unités du super-complexe, comme la SU I de la CcOx *caa3* (69 kDa) ou la protéine de Rieske (19 kDa). Or ces bandes ont été analysées par spectrométrie MALDI-TOFF sans révéler leur présence. L'analyse par spectrométrie de masse Orbitrap sur un échantillon de super-complexe purifié permet d'identifier de nombreuses protéines, mais aucune sous-unité de la *bo3*.

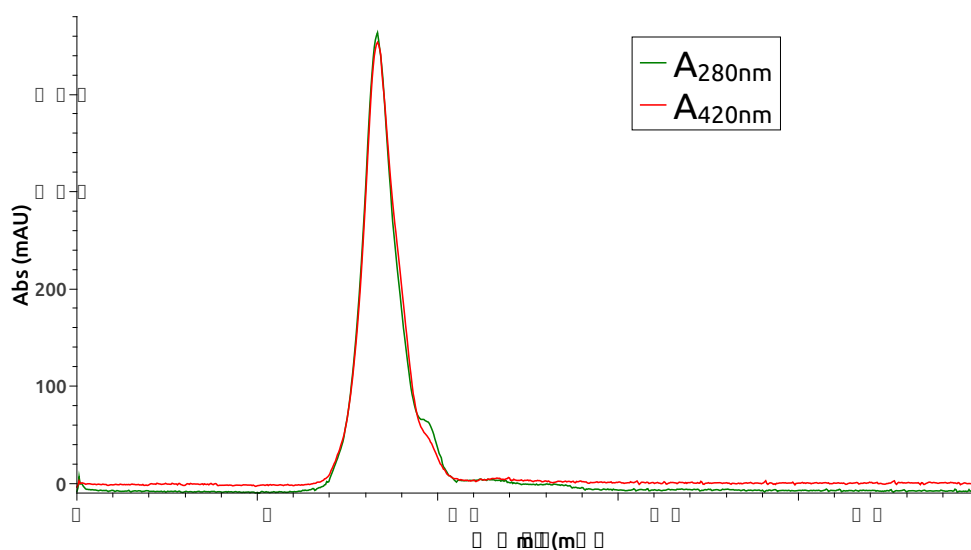
III.3.2 Polydispersité de l'échantillon

La question de la polydispersité a été abordée à partir du moment où nous sommes parvenus à isoler un objet relativement pur, et est donc apparue assez tardivement dans ce travail de thèse. Nous nous étions au préalable focalisés sur l'interaction entre le cytochrome *b₆c* et la CcOx *caa3*. La polydispersité pose la question de l'état oligomérique, qui est un sujet délicat sur lequel nous ne sommes pas en mesure de nous prononcer clairement (cf. IV.2.2). Nous disposons de plusieurs outils pour analyser l'homogénéité de l'échantillon. La chromatographie d'exclusion de taille a été largement utilisée lors de cette étude. La microscopie électronique et l'ultracentrifugation analytique sont des techniques plus adaptées pour étudier la polydispersité d'un échantillon. Nous avons observé notre échantillon par microscopie électronique en collaboration avec Janet Vonck et Werner Kühlbrandt, au Max Planck Institut de Francfort.

Hétérogénéité de l'échantillon

La microscopie électronique a été utilisée afin d'observer l'hétérogénéité d'un échantillon de super-complexe purifié en β -DDM à pH 8. Le protocole de purification utilisé est décrit dans la légende de la figure III.21. À la demande de W. Kühlbrandt, le super-complexe a été piégé en amphipols (A8-35) pour l'observation en microscopie électronique. Les amphipols sont des polymères amphipatiques, développés au laboratoire. Ils permettent de maintenir les protéines en solution, comme le ferait un détergent, mais possèdent des propriétés différentes. Ils sont notamment connus pour stabiliser les protéines membranaires. De récentes études montrent que les amphipols peuvent être utilisés en microscopie électronique (Althoff *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2013) et pourraient faciliter la résolution de certaines structures. Nous n'avons pas cherché à travailler avec ces molécules au préalable car elles posent des problèmes pour la cristallisation.

Les images de microscopie électronique du super-complexe en coloration négative sont présentées figure III.21. Les échantillons piégés en amphipols présentent des structures en forme de filaments. Ce phénomène a aussi été observé avec la bactériorhodopsine et OmpF (Gohon *et al.*, 2008; Arunmanee *et al.*, 2014). L'ajout de 0,4 mM de β -DDM permet de "solubiliser" ces filaments, et on retrouve alors le même type d'image qu'avec les super-complexes en β -DDM, qui n'ont pas vus d'amphipols. Ces échantillons permettent d'observer différents objets avec des tailles et des formes variées, révélant une hétérogénéité de l'échantillon qui pourtant semblait homogène sur tamis moléculaire (cf. figure III.21a). L'hétérogénéité n'est pas due à la congélation



(a) Profil d'élution sur tamis moléculaire de l'échantillon

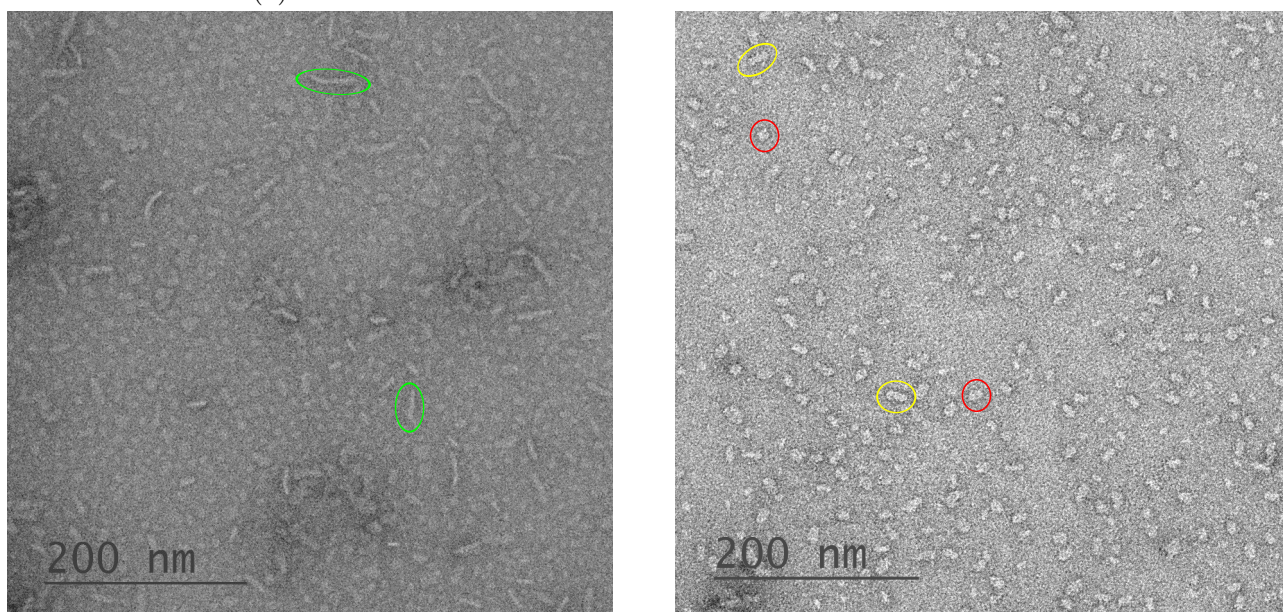
(b) EM du super-complexe de *G. stearothermophilus*

FIGURE III.21 – Microscopie électronique du super-complexe. (a) : profil d'élution sur la colonne Superdex 200 du super-complexe en A8-35. Les membranes sont solubilisées par 15 mM de β -DDM à pH 8, puis chargées sur une colonne Q ceramic 100ml (Tampons utilisés : $A_{1,D}$ et $B_{1,D}$, cf. tableau II.3). Le pic est centrifugé sur un gradient de saccharose, la bande basse est ensuite injectée sur une colonne Mono Q, le pic est dialysé et réinjecté (tampons $A_{1,D}$ et $B_{1,D}$). Le pic est concentré puis passé sur une colonne Superdex 200 (tampon $C_{1,D}$). Le super-complexe solubilisé en β -DDM est alors piégé en amphipol A8-35, puis réinjecté sur la colonne Superdex 200 (tampon : 20 mM Tris HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,004mg/ml A8-35). (b) : Images de microscopie électronique du super-complexe de *G. stearothermophilus*. Les échantillons de super-complexe sont déposés sur une grille de carbone, et colorés négativement par 1 % (w/v) acétate d'uranyle (coloration négative). Gauche : le super-complexe en APol, certaines des structures en filament sont indiquées en vert. Droite : le super-complexe en β -DDM, des objets de différentes tailles et formes sont observés : en jaune, des objets allongés d'environ 26 Å, en rouge des objets plus ronds d'environ 15 Å.

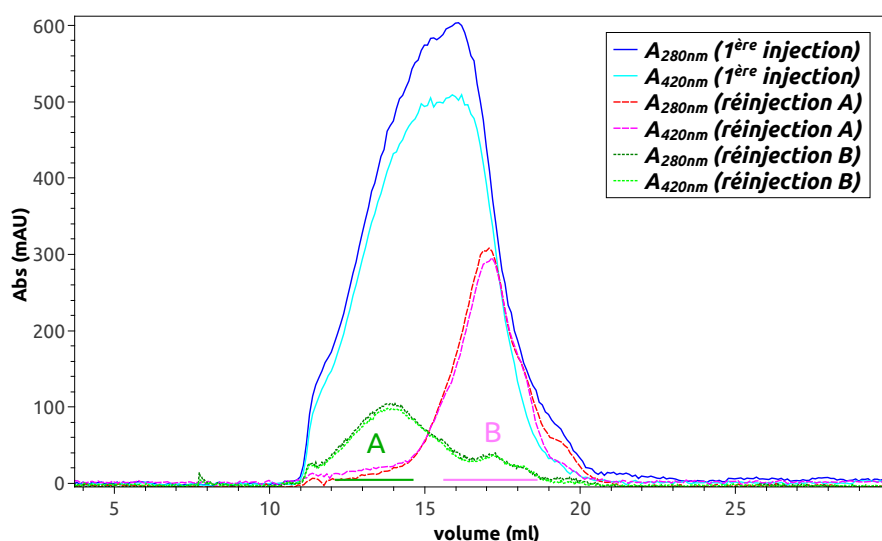


FIGURE III.22 – **Réinjection de différents pics sur la colonne Tsk G4000sw.** Le protocole de purification est celui décrit dans III.2.3. Les courbes bleues représentent l’injection de l’échantillon sur gel filtration en fin de purification. Le pic hétérogène a été séparé en deux parties : A et B, chacune réinjectée sur la colonne.

et décongélation, car cette expérience a été répétée avec un échantillon juste après l’élution du tamis moléculaire, et la même hétérogénéité est observée. De plus, le profil de l’échantillon sur une colonne Tsk G4000sw (plus résolutive) d’un échantillon de super-complexe reste identique après un cycle de congélation/décongélation. Les objets de forme allongés présentés en jaune sur la figure III.21b rappellent les images obtenues pour le super-complexe de *C. glutamicum* (Richers S, 2008).

Cette expérience montre que la colonne Superdex 200 ne permet pas de séparer les différentes populations de super-complexe. C’est après cette observation que le protocole a été modifié, en substituant la colonne Superdex 200 par la Tsk G4000sw, et en effectuant la purification à pH 7, pH compatible avec la matrice silicate du nouveau tamis moléculaire.

La figure III.22 présente le chromatogramme obtenu lors de la première utilisation de cette colonne (courbes bleues) : l’échantillon élué en plusieurs pics superposés. Des fractions du pic sont alors concentrées et réinjectées (A et B), et éluent en deux pics, un pic hors de la gamme de calibration de la colonne, avec un poids moléculaire apparent supérieur à 900 kDa (A), et un pic avec un poids moléculaire apparent de 570 kDa (B). Cette observation est cohérente avec les clichés de microscopie électronique et suggère une dissociation d’une population de super-complexe qu’il est difficile de stabiliser. On observe des variations d’une expérience à l’autre, en utilisant les mêmes protocoles.

Estimation du poids moléculaire

La chromatographie d'exclusion de taille permet d'estimer le rayon de Stokes et le poids moléculaire d'un complexe protéique par comparaison avec des protéines standards.

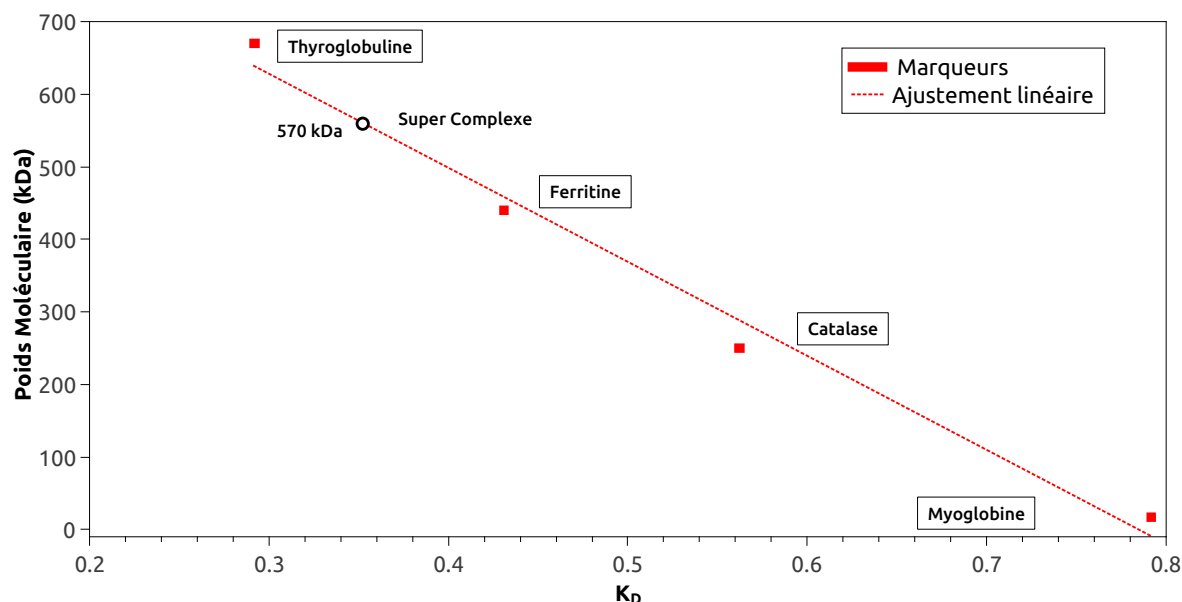


FIGURE III.23 – **Estimation du poids moléculaire du super-complexe par gel filtration.** Courbe de calibration de la colonne de gel filtration Tsk G4000sw, cf. II.2.1. Le poids moléculaire est estimé à partir d'un volume d'élution du pic de super-complexe de 17,4 ml, qui est le volume d'élution du super-complexe lors de nombreuses purifications. L'utilisation d'une échelle logarithmique pour les poids moléculaires permet d'obtenir le même résultat.

Une estimation peu précise du poids moléculaire du super-complexe lors de son élution sur colonne Tsk G4000sw est de 570 kDa (cf. figure III.23). Cette valeur doit être prise avec précaution, car elle est déterminée à partir de protéines standards solubles. Or, les protéines membranaires ne sont pas globulaires, on s'attend par exemple à une forme de disque pour le super-complexe étudié. De plus, la micelle de détergent entourant la protéine intervient également dans la migration, et entraîne un poids moléculaire apparent plus important. Par exemple, dans le cas du cytochrome b_6f de *C. reinhardtii*, le poids moléculaire calculé est de 205 kDa alors que la valeur expérimentale est de 310 kDa (Breyton *et al.*, 1997). Ces résultats seront discutés plus en détails dans IV.2.2.

Plusieurs populations de super-complexe

Plusieurs populations de super-complexe ont été détectées lors de cette étude.

- Le profil d'élution sur tamis moléculaire peut comporter plusieurs pics, contenant les mêmes sous-unités d'après les gels SDS-PAGE (cf. figure III.22). Ces observations sont

confirmées par la migration des fractions sur gel natif CN-PAGE (cf. figures ?? et III.16), montrant la coexistence de plusieurs populations de super-complexe, à différents poids moléculaires.

- La microscopie électronique révèle la présence d'objets de différentes tailles.
- La migration sur gradient de saccharose d'un échantillon purifié entraîne l'apparition de deux bandes colorées sur le gradient, correspondant à deux populations de super-complexe d'après les gels SDS-PAGE (cf. figure III.24).

Nos expériences suggèrent la présence d'un même super-complexe, mais dans différents états oligomériques, dont deux reviennent majoritairement : un super-complexe d'un poids moléculaire approximatif de 570 kDa (d'après l'élution sur tamis moléculaire) et migrant à proximité du marqueur de 480 kDa, et un super-complexe éluant hors de la zone de calibration de la colonne Tsk G4000sw (donc d'un poids moléculaire supérieur à 800 kDa) et migrant entre les marqueurs 480 et 720 kDa sur le gel natif. La migration des protéines sur gel natif dépend essentiellement de leur charge, ce qui en fait une technique très approximative pour déterminer des poids moléculaires.

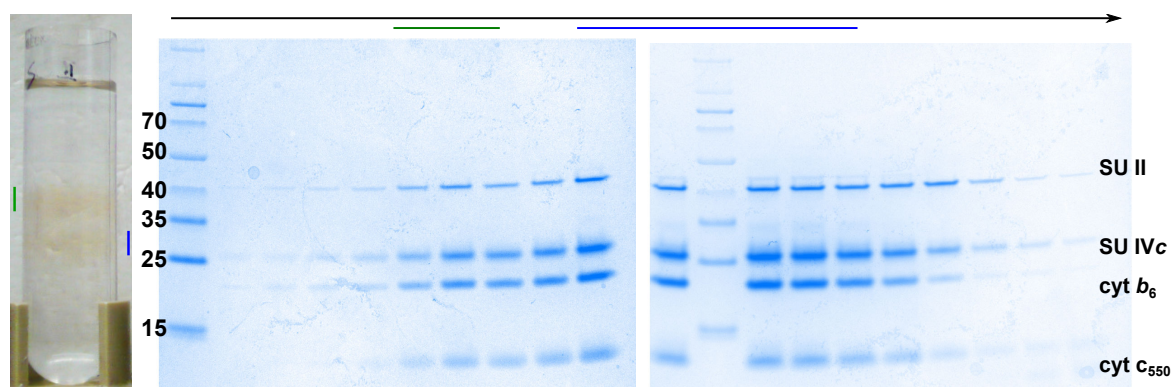
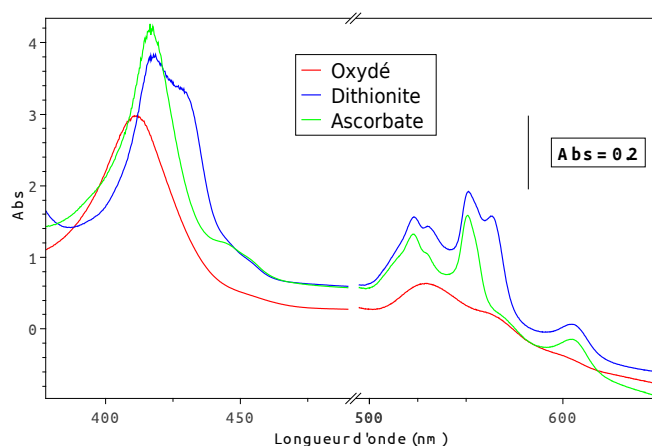


FIGURE III.24 – Migration sur gradient de saccharose d'un échantillon purifié. L'échantillon purifié par deux passages sur colonne htq 5ml est déposé sur un gradient de saccharose de 4 ml. **Gauche** : profil du gradient, les traits verts et bleus représentent les deux bandes contenant le super-complexe. **Droite** : Gel SDS-PAGE coloré au TMBZ des fractions du gradient.

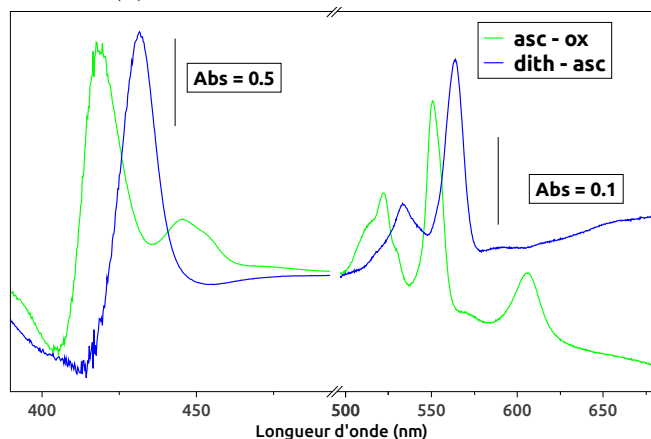
III.3.3 Spectroscopie visible

La spectroscopie visible permet de visualiser les hèmes bas spin *a*, *b* et *c* présents dans l'échantillon, à respectivement 605 nm, 564 nm et 550 nm. Les hèmes haut spin tels que l'hème *c_i* ou l'hème *a₃* possèdent également une contribution dans le visible, mais leurs signaux sont faibles et étalés, et se retrouvent "noyés" dans les signaux des hèmes bas spin. Si l'échantillon contient un ou des hèmes de type *o*, il sera également compliqué d'observer leur signal, car celui-ci sera superposé à celui des hèmes *b*.

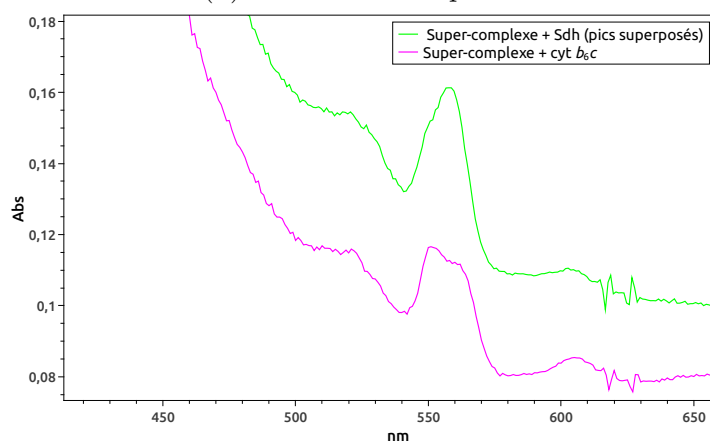
Le contenu en hèmes des échantillons de super-complexe purifié est déterminé par des diffé-



(a) Spectres de super-complexe purifié



(b) Différences de spectres



(c) Spectres d'échantillons partiellement purifiés

FIGURE III.25 – **Spectres visibles de super-complexe.** (a) Spectres à différents états redox (b) Différences de spectre de super-complexe purifié. (c) Spectres d'échantillons réduits au dithionite, avant cristallisation, dilués d'un facteur 50. Les spectres des figures a et b ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Carry 5E, les spectres de la figure c sur un spectrophotomètre HP 8453. Les ratios des hèmes a:b:c sont, pour l'échantillon (a) : 1:1,9:2, pour l'échantillon de la courbe rose : 1:2:1,6 et celui de la courbe verte : 1:2,5:2,2.

rences de spectres visibles à différents états redox. Le super-complexe est à l'état oxydé en fin de purification, l'ajout d'ascorbate permet la réduction de la fin de la chaîne de transfert (les hèmes *c* et *a*). Le dithionite lui réduit les hèmes *b*.

Les spectres obtenus sur les échantillons purifiés et les concentrations en hèmes calculées à partir de ces spectres ont pendant longtemps été très inconstants (cf. figure III.25c). La mauvaise séparation des pics mène à la fois à une contamination par la Sdh qui contient des hèmes de type *b*, et par le cytochrome *b₆c* isolé, contenant trois hèmes bas spin : deux *b* et un *c*, entraînant des changements au niveau du ratio des différents hèmes de l'échantillon, et pouvant expliquer en partie la faible amplitude relative du pic à 605 nm, correspondant à la bande α des hèmes *a*.

Ce pic correspond aux bandes α superposées de l'hème bas spin *a* et de l'hème haut spin *a₃* de l'oxydase. Ces deux hèmes possèdent des coefficients d'extinction molaire (ε) très différents : les hèmes haut spin ont généralement une bande plus étalée que les hèmes bas spin, donc un ε plus faible. La valeur de $11,6 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ utilisée durant cette thèse est censée prendre en compte les deux espèces. Les concentrations calculées à partir de ce pic sont assez variables, possiblement à cause d'une hétérogénéité au niveau de l'hème haut spin de la CcOx *caa₃*, pouvant être un hème *o* ou *a* (cf. III.3.5), influant les calculs de concentration. L'amélioration de la purification, et notamment l'introduction de la colonne Mono Q a permis d'obtenir des spectres un peu plus reproductibles d'une purification à l'autre. Cependant, la question de l'amplitude du signal du pic à 604 nm s'est posée tout au long de cette thèse, et sera discutée plus en détail dans IV.2.2.

III.3.4 Étude du super-complexe par spectroscopie RPE

La spectroscopie RPE a été utilisée pour la caractérisation du super-complexe avec deux objectifs principaux :

- Suivre la présence de la protéine de Rieske pendant la purification
- Confirmer la présence d'un hème haut spin de type *c_i* dans le site *Q_i* et le caractériser.

Pour cela, des spectres ont été enregistrés à différentes étapes, et avec des échantillons résultants de différents protocoles de purification, ainsi que sur des membranes. Le spectre RPE du super-complexe purifié est présenté figure III.26. Le spectre de l'échantillon oxydé contient le signal d'un hème haut spin à $g = 6$ qui correspond à l'hème *c_i*, un signal autour de $g = 3$ correspondant à l'hème *a* bas spin de la CcOx *caa₃*, ainsi que le signal à $g = 2$ du cuivre *Cu_A* appartenant également à l'oxydase. Le signal des hèmes *b* se trouve vers $g = 3.5$. Les hèmes *c* étant proches de $g = 3$ apparaissent comme un épaulement du pic de l'hème *a*. La réduction à l'ascorbate entraîne la disparition du signal de cuivre et du pic d'hème *a*, et l'apparition du signal de la protéine de Rieske.

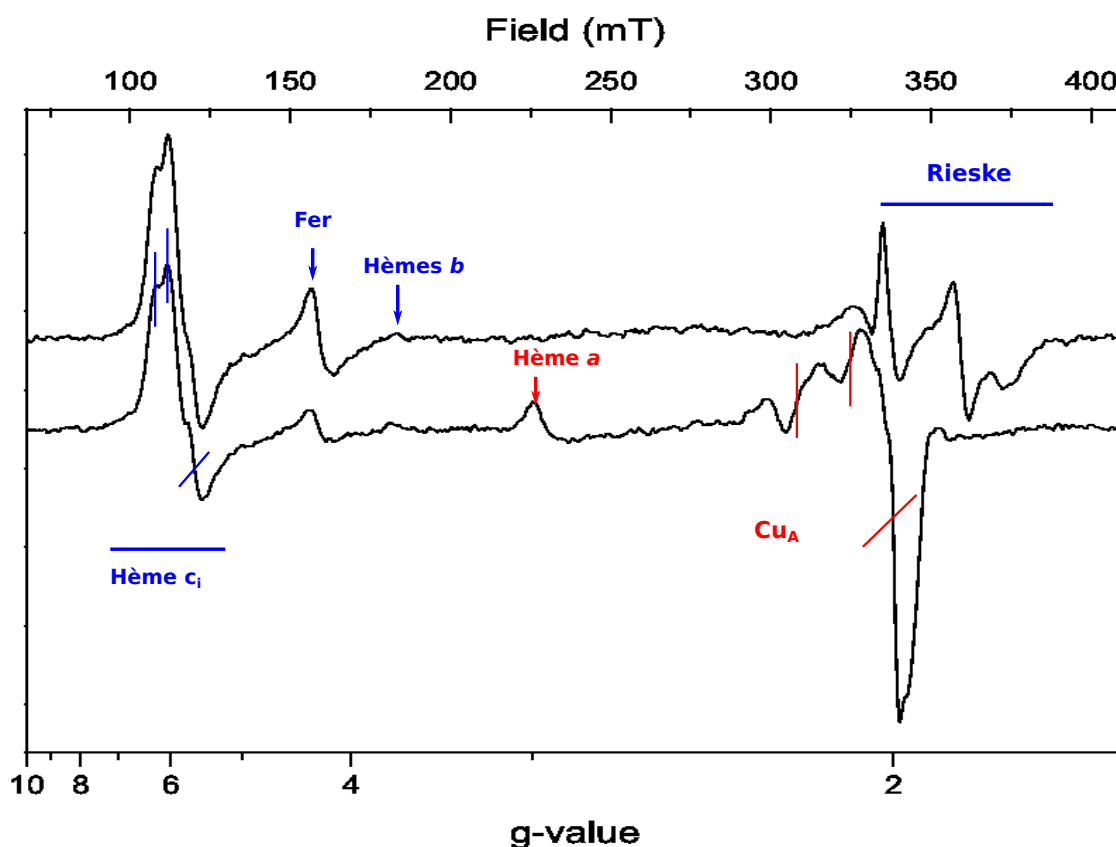


FIGURE III.26 – **Spectre RPE du super-complexe purifié.** Le super-complexe solubilisé en β -DDM est purifié par gradient de saccharose, deux étapes de chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Mono Q, suivies d'un tamis moléculaire sur colonne Tsk G4000sw. **Bas** : état oxydé au potentiel redox ambiant. **Haut** : spectre réduit à l'ascorbate (2 mM). En bleu : les cofacteurs du complexe *cytochrome b_6c* , en rouge ceux de la *CcOx caa_3* . L'axe des x supérieur représente le champs magnétique en mT (millitesla), alors que l'axe inférieur est donné en valeur g. Spectres enregistrés à 15 K, 6,4 mW.

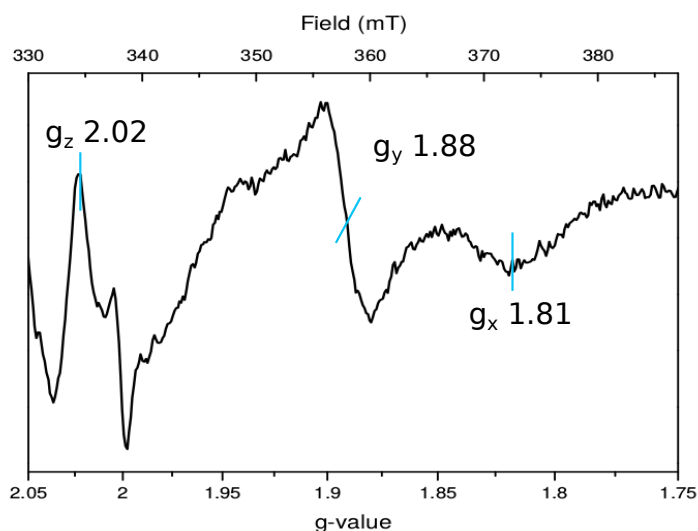


FIGURE III.27 – **Signal RPE de la protéine de Rieske.** Spectre enregistré à une température de 20K, atténuation des micro-ondes : 6,4 mW, en présence de NQNO et d'ascorbate.

La protéine de Rieske

Cette sous-unité des complexes Rieske/*b* participe à la formation du site Q_o d'oxydation des quinones, sur la face externe de la membrane. Son centre redox $[2Fe-2S]$ capte un des électrons relargués lors de l'oxydation d'hydroquinone, et par l'intermédiaire d'un changement de conformation, le transfère vers l'hème *c* de la sous-unité IV-*c*, dans le cas du cytochrome b_6c de *G. stearothermophilus*. La tridécyl-stigmatelline (ou TDS) est un mimétique de semiquinone, possédant une chaîne saturée et non ramifiée (cf. figure III.29), qui est utilisée comme inhibiteur du site Q_o . L'ajout de la TDS lors de la cristallisation du complexe cytochrome b_6f permet de diminuer les mouvements de la Rieske et facilite la formation de cristaux. Cette sous-unité est également impliquée dans la dimérisation des complexes Rieske/*b* : les domaines solubles interagissent avec un monomère, tandis que l'hélice transmembranaire de la Rieske est intégrée au second monomère. La monomérisation du complexe est accompagnée de la perte de cette sous-unité chez le cytochrome b_6f (Breyton *et al.*, 1997). Par analogie, sa présence est donc considérée comme un marqueur de stabilité et d'intégrité du complexe cytochrome b_6c dans nos conditions de purification. Les spectres RPE de cytochrome b_6c isolé après dissociation montrent la présence d'un signal de la Rieske lors de la réduction à l'ascorbate, suggérant que la dissociation du super-complexe n'affecte pas la stabilité du cytochrome b_6c (cf. figure III.28).

Le signal RPE du centre $[2Fe-2S]$ de la protéine de Rieske, présenté figure III.27, se décompose en trois signaux : un pic à $g_z = 2,02$, la dérivé à $g_y = 1,88$ et le signal $g_x = 1,81$. Il peut être utilisé pour étudier la fixation de substrats au niveau du site Q_o : l'occupation du site détermine la position et l'amplitude du signal g_x . Les spectres de RPE de la protéine de Rieske du super-complexe et du complexe cytochrome b_6c isolé en présence de TDS sont présentés figure III.28.

Le signal g_x de la Rieske est différent dans le super-complexe et dans le cytochrome b_6c isolé, ce qui suggère une différence d'occupation du site Q_o , avant même l'ajout d'inhibiteur. L'ajout de TDS sur l'échantillon de super-complexe purifié n'entraîne pas de modification du signal de la protéine de Rieske. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées à partir de cette observation :

1. La TDS ne se fixe pas au site Q_o
2. Le site pourrait être déjà occupé par une quinone. Une extraction de quinone sur des échantillons de super-complexe suivie d'une chromatographie sur couche mince permet de visualiser des quinones, qui pourraient se trouver au niveau des sites Q_i et Q_o .
3. La TDS se fixe au site Q_o , mais sa fixation aurait très peu d'influence sur la géométrie du cluster $[2Fe-2S]$.

Dans le cas du cytochrome b_6c isolé, le signal est bruité. Cependant, on peut observer un léger décalage du signal g_x lors de l'addition de l'inhibiteur, également observé dans le cytochrome b_6f de *C. reinhardtii* (Le Bas, 2013). Ce décalage correspond à de petits changements d'angles (quelques degrés) au niveau des liaisons du cluster aux histidines et cystéines.

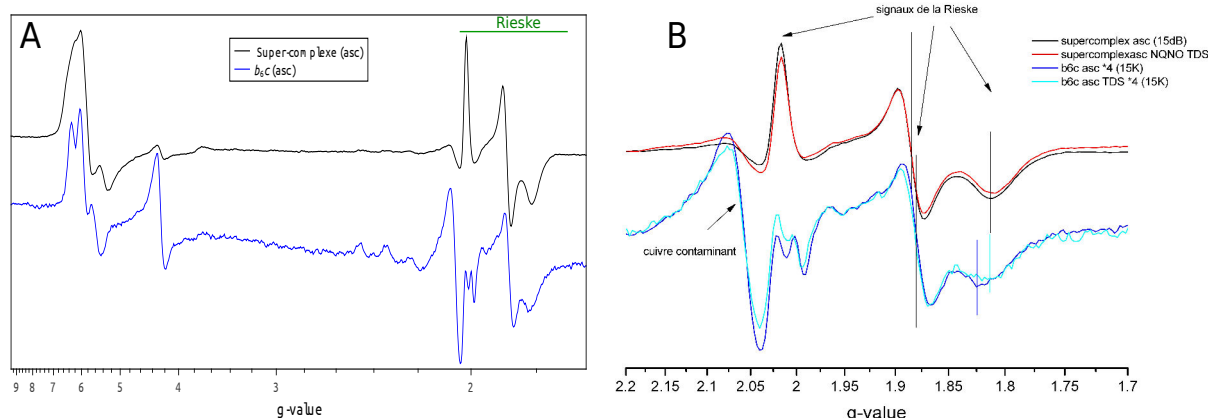


FIGURE III.28 – **Signal RPE de la protéine de Rieske en présence de TDS.** (A) Spectres RPE du cytochrome b_6c isolé et du super-complexe réduits à l'ascorbate. Les spectres sont normalisés sur le signal de la protéine de Rieske. (B) Fixation du TDS sur la protéine de Rieske. Le cytochrome b_6c isolé est purifié selon le protocole suivant : les membranes sont solubilisées à 30 mM de FC₁₄ pendant 45 min, puis le surnageant de centrifugation est chargé sur un gradient de saccharose de 10 ml et centrifugé 15 h à 30.000 rpm. La bande basse du gradient est prélevée avec une seringue et injectée sur une colonne htq 5ml. Le pic de cytochrome b_6c isolé est élué à 180 mM de NaCl (cf. figure III.11) et la CcOx caa_3 isolée à 230 mM de NaCl. La fraction 21 contenant le cytochrome b_6c et la fraction 28 contenant la CcOx caa_3 sont concentrées à l'aide d'un centricon (limite de filtration : 100 kDa) puis congelées. Si la Rieske était dissociée du cytochrome b_6c isolé, elle serait perdue pendant la concentration. Or le rapport c_i /Rieske est identique entre le cytochrome b_6c et le super-complexe. Spectres enregistrés à 15 K, 6,4 mW.

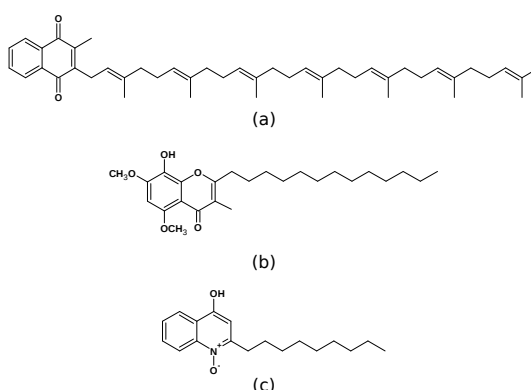


FIGURE III.29 – **Quinones et analogues de quinones** (a) Ménaquinone 7 (MK-7). (b) Tridécylstigmatelline (TDS), nom IUPAC : 8-Hydroxy-5,7-Dimethoxy-3-Methyl-2-Tridécyl-4H-Chromen-4-One. (c) NQNO (nonyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide), nom IUPAC : 1-Hydroxy-2-Nonylquinolin-4-One.

Lors de la titration des membranes, le signal de la protéine de Rieske, notamment le g_x , reste inchangé lors du passage de la quinone en hydroquinone, traduisant une faible sensibilité de la géométrie du cluster par rapport à l'occupation du site Q_o , comme dans le cas du cytochrome b_6f . Dans le cas de certains cytochrome bc_1 au contraire, comme chez *R. capsulatus* (Liebl *et al.*, 1997), le signal g_x de la Rieske subit d'importants changements suite à la fixation de la TDS, traduisant une sensibilité beaucoup plus forte de la géométrie du cluster à l'occupation du site par l'analogue de quinone. Nos observations divergent des données publiées pour *Bacillus sp. PS3*, où le passage de quinone à hydroquinone, ainsi que la fixation de la stigmatelline, entraînent

une modification nette du signal g_x de la Rieske (Liebl *et al.*, 1992).

Étude de l'hème c_i

L'hème c_i présent au sein du site Q_i a été visualisé chez *G. stearothermophilus* par coloration TMBZ sur gel SDS-PAGE (cf. III.2). Cet hème haut spin atypique a été étudié au sein des complexes cytochrome b_6f par différentes techniques : biochimie et coloration au TMBZ, mutagenèse, cristallographie aux rayons X, spectroscopie visible ou RPE. Cependant, sa fonction au sein du site Q_i reste actuellement inconnue.

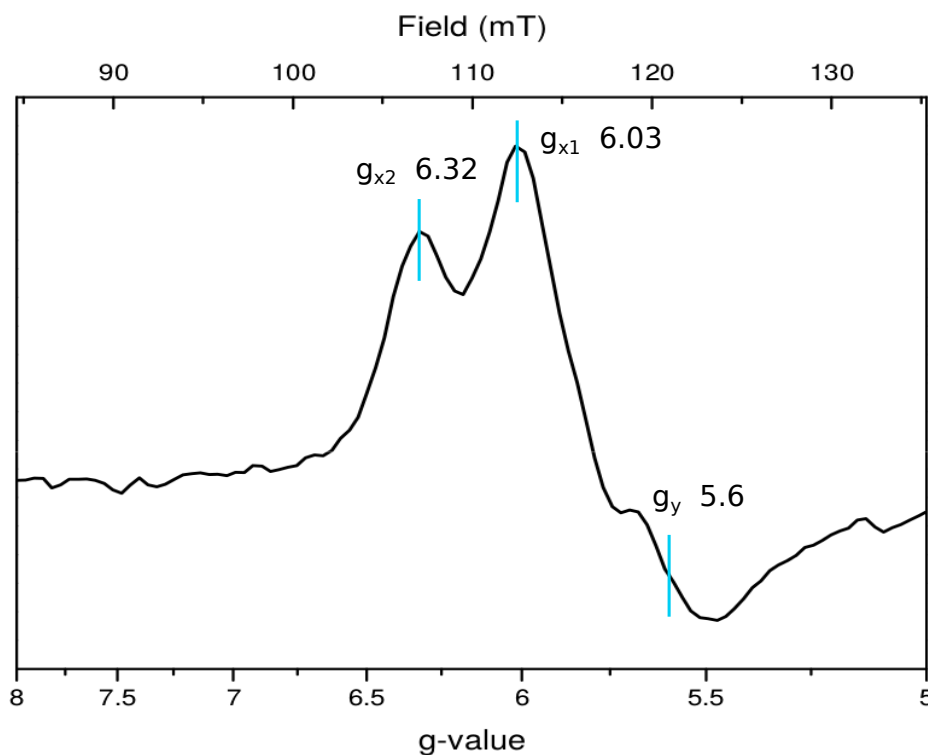


FIGURE III.30 – **Spectre RPE de l'hème c_i** , d'un échantillon de super-complexe purifié. Température d'enregistrement : 6 K, atténuation des micro-ondes : 64 mW.

Cet hème a été caractérisé par spectroscopie RPE, une méthode de choix pour l'étude des hèmes haut spin, au sein de différents complexes du "green clade" :

- les complexes cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii* et d'épinards (Baymann *et al.*, 2007), ou de la cyanobactérie *Mastigocladus laminosus* (Zhang *et al.*, 2004). Ces complexes sont impliqués dans le processus de photosynthèse oxygénique.
- les complexes cytochrome b_6c de *Heliobacterium modesticaldum* et *Heliobacterium mobilis* (Ducluzeau *et al.*, 2008), appartenant à des chaînes photosynthétiques anoxygéniques.

L'hème c_i du cytochrome b_6c de *G. stearothermophilus* possède un environnement différent de celui de *C. reinhardtii*, et il est plus proche de celui des Hélobactéries. Notre étude est une

des rares études RPE d'un hème c_i , et la première dans un contexte respiratoire.

L'hème c_i de *G. stearothermophilus*, comme tout hème haut spin, possède un signal RPE lorsqu'il est dans son état oxydé, qui disparaît quand l'hème est réduit. Ce signal est composé de deux g_x : $g_{x1} = 6,03$, $g_{x2} = 6,32$ et d'un g_y à 5,6 (cf. figure III.30).

Comparaison avec l'hème c_i du cytochrome b_6f

Le spectre de l'hème c_i du cytochrome b_6f de *Chlamydomonas reinhardtii* est un spectre d'une complexité atypique pour un hème haut spin, qui n'est pas compris à ce jour. Ce spectre est simplifié par l'ajout du NQNO, un analogue de quinone qui se lie à l'hème et stabilise son environnement (cf. figure III.31). Ce spectre autour de $g = 6$ possède un pic (dédoublé) et un signal de dérivée, ce à quoi on pourrait s'attendre pour une espèce paramagnétique qui interagit avec d'autres composés paramagnétiques.

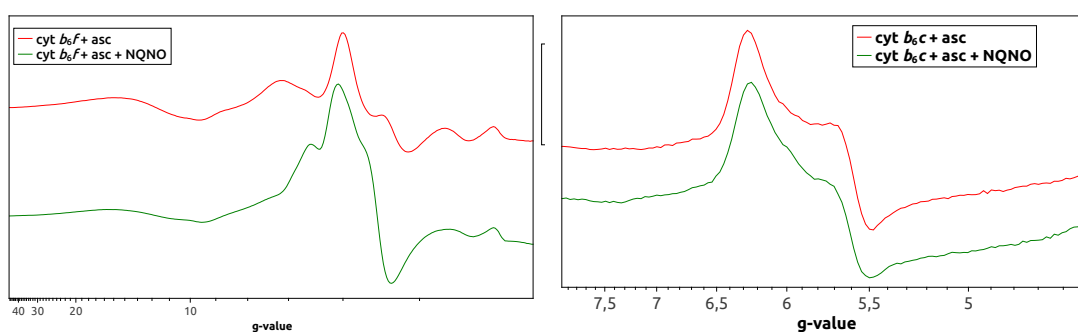


FIGURE III.31 – **Spectre de l'hème c_i de *Chlamydomonas reinhardtii* et de *Heliobacterium modesticaldum*.** Les spectres rouges sont les spectres des complexes réduits à l'ascorbate, les spectres verts sont les spectres après ajout du NQNO. Spectres enregistrés à 6K, 64 mW. **Gauche** : cytochrome b_6f de *C. reinhardtii*. (Données : Frauke Baymann, publiées dans Baymann *et al.* (2007)) **Droite** : cytochrome b_6c de *Heliobacterium modesticaldum* à pH 6. (Données : Frauke Baymann, publiées dans Ducluzeau *et al.* (2008)).

Le signal de l'hème c_i de *G. stearothermophilus* est comparable à celui de l'hème c_i de *C. reinhardtii* en présence de NQNO : il possède un signal rhombique avec un pic composé de deux g_x . La rhombicité du signal correspond à la géométrie du ligand par rapport au plan de l'hème : les hèmes haut spin ont typiquement des signaux g_x et g_y superposés à $g = 6$, dans le cas d'une symétrie axiale, ou deux signaux séparés autour de $g = 6$ dans le cas d'un centre rhombique (Baymann *et al.*, 2007). Le dédoublement du pic résulte soit de la présence de deux populations avec différents degrés de rhombicité, soit d'une seule population possédant un signal rhombique dédoublé car c_i interagit avec un autre centre paramagnétique. C'est cette seconde hypothèse qui est retenue dans le cas du cytochrome b_6f de *C. reinhardtii*, où l'hème c_i interagit avec l'hème b_H dans son état oxydé. Les deux hèmes sont distants de seulement 9,8 Å, une des distances les plus courtes observées pour une paire d'hème.

Le dédoublement du signal chez *G. stearothermophilus* est probablement dû lui aussi à l'interaction avec l'hème b_H , mais dans ce cas de figure il n'est pas possible de le prouver expérimentalement. En effet, chez *C. reinhardtii*, les potentiels redox des hèmes b_H (-20 mV) et c_i en présence de NQNO (-175 mV) (Alric *et al.*, 2005) permettent d'observer l'hème c_i en présence de b_H réduit ou oxydé. La réduction de b_H permet de visualiser la disparition du dédoublement dans le signal (Baymann *et al.*, 2007). Chez *G. stearothermophilus*, le potentiel redox de l'hème b_H est très bas (-220 mV, cf. III.4), et le NQNO ne modifie pas le potentiel de l'hème c_i , ce qui ne permet pas l'observation de c_i oxydé en présence de b_H réduit. Dans nos conditions d'observation de l'hème c_i en RPE, l'interaction serait toujours présente.

Spectres de l'hème c_i en présence de NQNO

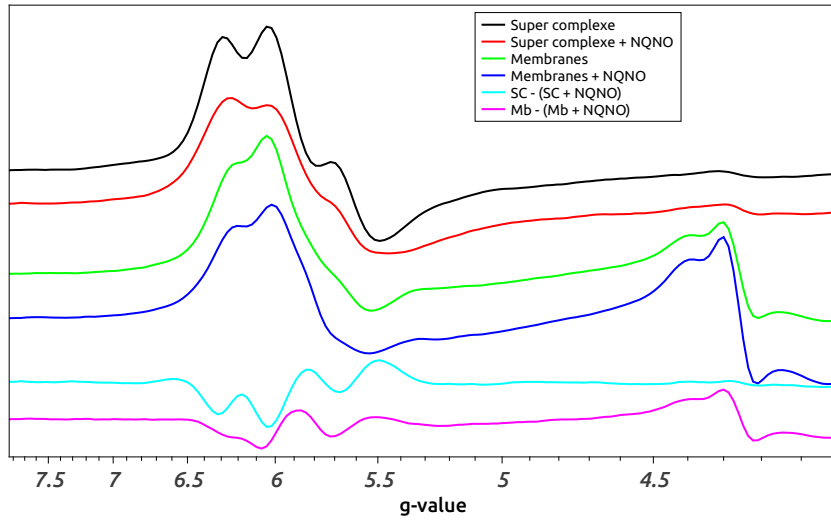


FIGURE III.32 – **Spectre RPE du super-complexe en présence de NQNO.** Température d'enregistrement : 6K, atténuation des micro-ondes : 64 mW.

Lorsqu'un ligand axial est ajouté à l'hème c_i , celui-ci conserve son état haut spin. Cette propriété permet de tester la fixation de différents ligands sur cet hème, en observant leur effet sur le signal RPE autour de $g = 6$. Les spectres de l'hème c_i en présence de NQNO (cf. figure III.32) ne présentent pas de changements importants, comme observé chez *H. modesticaldum* (voir figure III.31) (Ducluzeau *et al.*, 2008).

Le NQNO peut remplacer le ligand axial putatif glutamate et se fixer au fer de l'hème, ou simplement modifier l'environnement du site Q_i . Dans le cytochrome b_6f , le NQNO se lie au fer de l'hème en modifiant à la fois son spectre et son potentiel redox. Chez *G. stearothermophilus*, il semblerait que le NQNO entre dans le site Q_i et en change la géométrie, entraînant une légère modification du signal de c_i . Cependant, il ne semble pas se fixer à l'hème comme dans le cas du cytochrome b_6f . Cela peut s'expliquer par le fait que la quinone elle-même ne se fixe pas nécessairement au fer de l'hème.

Sensibilité au pH et variation du signal de l'hème c_i

D'après la modélisation et les alignements de séquences, l'hème c_i du cytochrome b_6c , contrairement à celui du cytochrome b_6f , possède un candidat potentiel pour un ligand axial de l'hème : un glutamate (cf. I.3.3). Ce résidu étant protonable, une étude de l'influence du pH sur le signal de l'hème c_i a été menée afin de tester cette hypothèse (cf. figure III.33b). Une modification du spectre est observée avec la variation du pH, produisant un effet faible : la diminution du pH de l'échantillon s'accompagne d'un élargissement des signaux g_x ainsi que d'une perte progressive du dédoublement. Cependant, cet effet est réversible : lorsque le pH est ramené à une valeur plus élevée, le signal retrouve une forme proche de sa forme initiale.

Ces changements peuvent être interprétés de plusieurs façons (cf. figure III.34) :

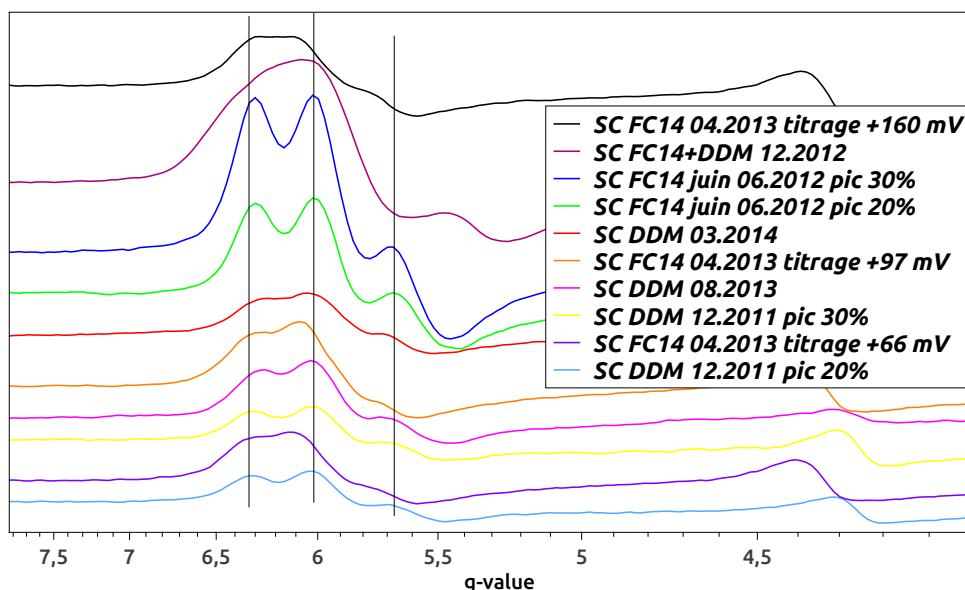
- ils peuvent traduire une modification de l'interaction de l'hème c_i avec le ligand glutamate putatif. Cette interaction peut être directe ou médiée par une molécule d'eau. L'absence de changement radical sur le spectre, attendu si le résidu glutamate était protoné puis déprotoné, peut soit favoriser plutôt l'hypothèse de la molécule d'eau, soit être due au fait que le pK du glutamate dans la protéine est à un pH trop bas pour permettre une protonation à des valeurs de pH qui ne mettent pas en cause l'intégrité de la protéine.
- ils peuvent également provenir d'une modification de l'interaction de l'hème c_i avec l'hème b_H , qui dans le cas du cytochrome b_6f est médiée par une molécule d'eau.

Les changements du signal de l'hème c_i restent réversibles sur une large gamme de pH indiquant que le site Q_i et l'hème c_i résistent à ce traitement. Cela permet d'obtenir des indications sur l'état de stabilité de la protéine, car le site Q_i est formé par la SU IV- c et le cytochrome b_6 .

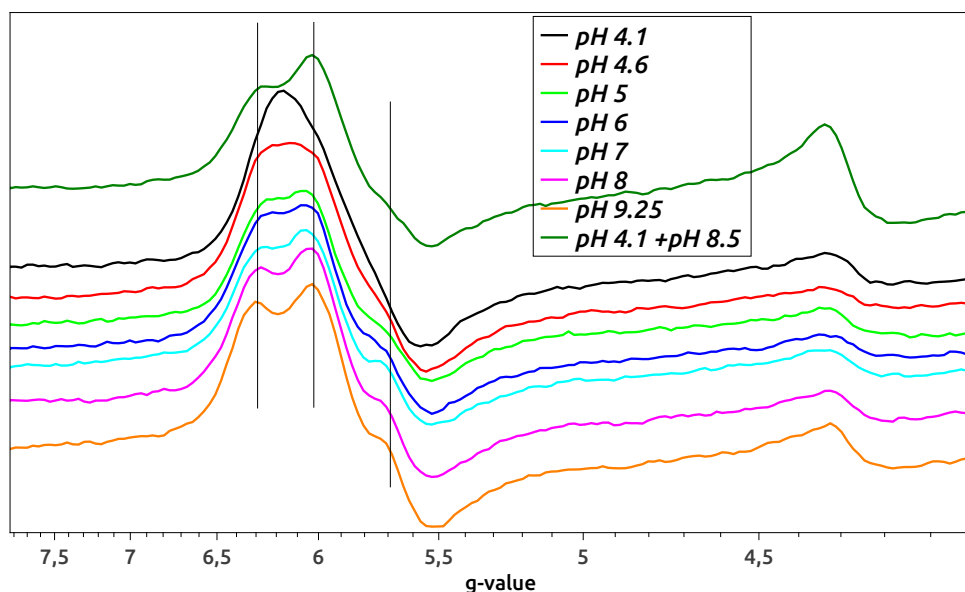
Le signal de l'hème c_i peut varier d'une préparation à l'autre (cf. figure III.33a). Tous les spectres obtenus possèdent deux signaux g_x et g_y séparés autour de $g = 6$, traduisant un centre rhombique, et tous sauf un sont dédoublés au niveau du g_x . Les variations se retrouvent principalement au niveau de la forme du split, pouvant provenir de changements de l'environnement de l'hème. Elles sont similaires à celles induites par le pH, pouvant survenir durant la purification. Ces variations pourraient également traduire des différences d'occupation du site Q_i , mais nous n'avons pas de données expérimentales pour discuter cette hypothèse.

Le site actif de l'oxydase

Le couplage entre l'hème haut spin et le centre Cu_B formant le site actif de l'oxydase rend leur observation en RPE impossible dans des conditions standards. Pour observer l'hème haut spin a_3 du site actif, il convient de découpler son interaction avec le cuivre en ajoutant par exemple de l'azoture de sodium (NaN_3). L'azide ou azoture de sodium est toxique, en se fixant à l'hème du site actif, il entraîne une inhibition de l'oxydase terminale.



(a) Variations de spectre de l'hème c_i



(b) Sensibilité au pH

FIGURE III.33 – **Effet du pH sur le signal RPE de l'hème c_i .** (a) Variations de spectre de l'hème c_i provenant de différentes purifications. (b) Influence du pH sur le signal RPE de l'hème c_i . 100 μ l de super-complexe purifié et concentré à ~ 1 μ M est dilué dans 100 μ l d'un mélange de tampon à 100 mM (MES, piperazine, HEPES, MOPS) dont le pH est ajusté à différentes valeurs. L'échantillon est dialysé 45 min contre 100 mM du mélange de tampons, puis placé dans un tube RPE et congelé. La valeur de pH de l'échantillon de la courbe verte foncée est inconnue : 50 μ l du mélange de tampon à pH 8,5 sont ajoutés à l'échantillon à pH 4,1. Spectres enregistrés à 15K, atténuation des micro-ondes : 64 mW.

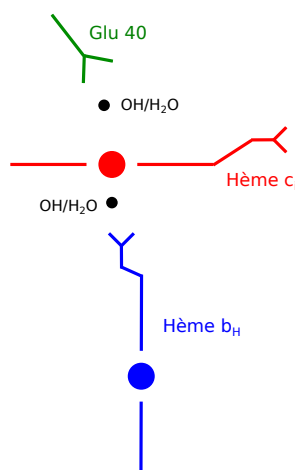
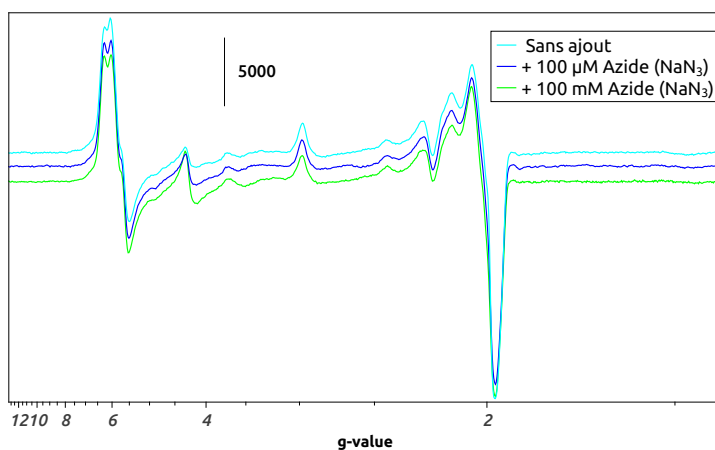


FIGURE III.34 – **Schéma hypothétique de l'organisation du site Q_i .** Il n'existe aucune données structurales sur le site Q_i du cytochrome b_6c . Un modèle, basé sur le site Q_i du cytochrome b_6f , a été publié dans Ducluzeau *et al.* (2008), mais la faible identité de séquence au niveau de ce site ne permet pas de s'appuyer de manière sûre sur ce modèle. Le ligand glutamate putatif est conservé dans plusieurs séquences, alors que les acides aminés autour ne le sont pas (cf. I.3.3). L'interaction entre c_i et ce possible ligand peut être directe ou indirecte, via une molécule d'eau ou un ion hydroxyde. De même, l'hypothèse de la présence d'une molécule d'eau entre c_i et b_H est tirée de l'analogie avec le complexe cytochrome b_6f et n'a pas encore pu être mise en évidence chez *G. stearothermophilus*.

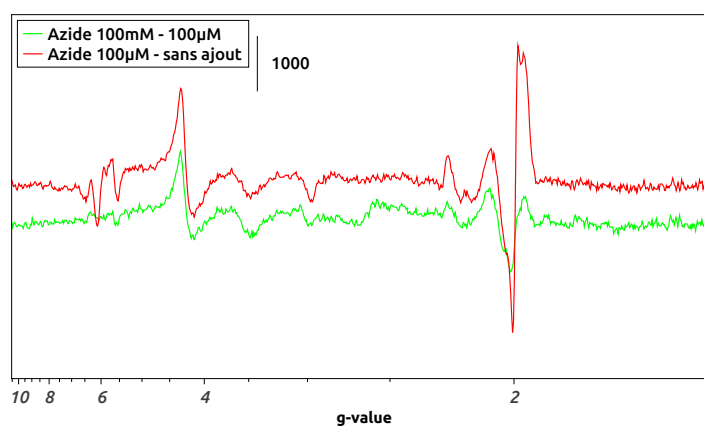
L'ajout d'azide ne modifie pas radicalement le spectre (cf. figure III.35), et aucune contribution supplémentaire n'est observée autour de $g = 6$ dans la région des hèmes haut spin. Le signal à $g = 2,9$ observé dans l'oxydase de la mitochondrie de cœur de bœuf (Wever et van Gelder, 1974) est également absent de nos spectres. Il semble donc que le site actif de la CcOx *caa3* n'ait pas été découplé par l'ajout de l'inhibiteur dans nos conditions expérimentales. Par contre l'ajout d'azide entraîne une légère diminution du pic de l'hème *a* et de petits changements au niveau de l'hème c_i .

Le super-complexe dans la membrane

Les spectres RPE ont été enregistrés sur des membranes. La figure cf. III.36 présente les spectres RPE de membranes, oxydées et réduites à l'ascorbate, superposées aux spectres du super-complexe purifié. Une grande partie des signaux présents dans les spectres de membranes sont attribués au super-complexe, montrant sa sur-expression naturelle au sein de la membrane de *G. stearothermophilus*. Il est intéressant de noter que le spectre des membranes sans ajout (courbe bleue foncée) possède déjà un signal de la protéine de Rieske, traduisant un échantillon partiellement réduit. Cet état réduit est souvent observé sur les membranes. En effet, pendant la culture, toutes les chaînes sont réduites et les membranes sont pleines d'éléments réducteurs (quinones réduites, NADH...). Le cassage des cellules n'est souvent pas suffisant pour aérer et oxyder la totalité de l'échantillon.



(a)



(b)

FIGURE III.35 – **Spectres de super-complexe en présence d'azide de sodium** (a) Spectres du super-complexe purifié en présence ou en absence de NaN_3 (b) Différences de spectres de super-complexe purifié en présence ou en absence de NaN_3 . Spectres enregistrés à 15 K, 6,4 mW

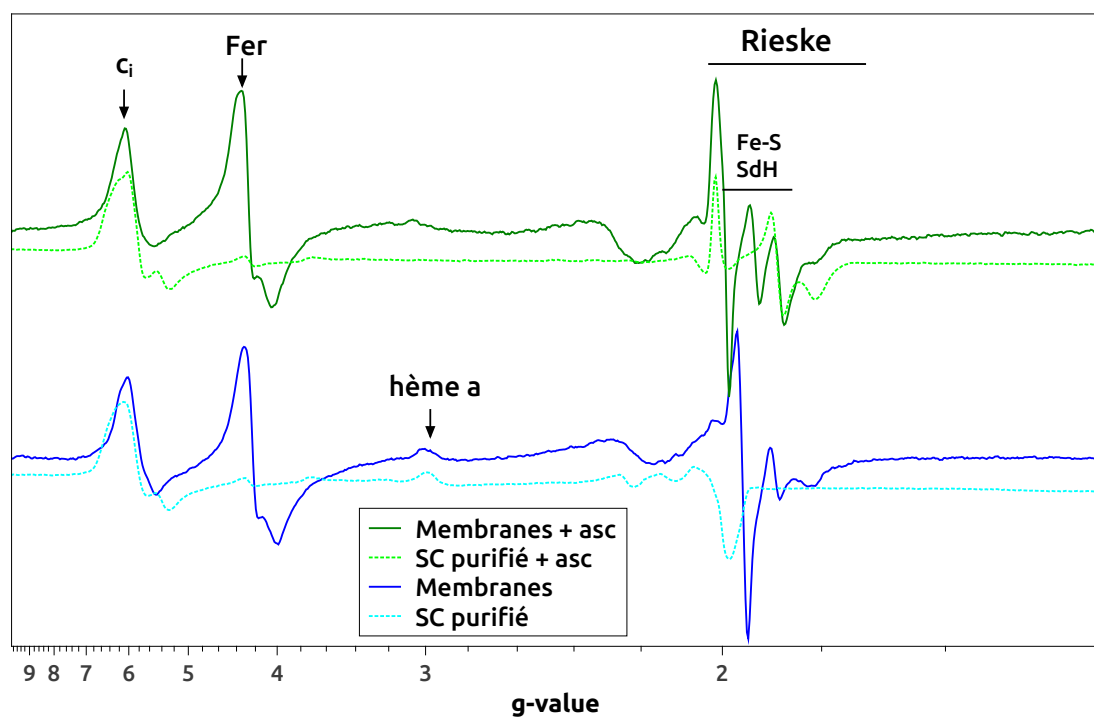


FIGURE III.36 – Spectres RPE du super-complexe purifié et de membranes de *G. stearothermophilus*. Bleu foncé : membranes "oxydées", bleu azur, pointillés : super-complexe oxydé, à l'air (potentiel redox ambiant). Vert sombre : membranes réduites, vert clair, pointillés : super-complexe réduit, à l'ascorbate (2 mM). Les spectres sont normalisés sur le signal de l'hème c_i . Spectres enregistrés à 15 K, 6,4 mW.

III.3.5 Fixation du CO sur le super-complexe

Il a été observé que les conditions de culture mènent à l'expression de différentes oxydases terminales, pouvant entraîner une hétérogénéité du contenu en oxydase de l'échantillon. Même si nos données biochimiques suggèrent une présence majoritaire de la CcOx *caa3* (cf. III.1), la faible amplitude de la bande α des hèmes *a* obtenue en spectroscopie visible nous a poussé à entreprendre une analyse spectroscopique plus approfondie de nos échantillons. L'identification des différentes oxydases terminales présentes par des techniques biophysiques n'est pas toujours une tâche aisée. L'observation de leurs sites actifs n'est pas réalisable par spectroscopie RPE, en raison du couplage existant entre les deux cofacteurs. En spectroscopie visible, les hèmes haut spin et le cuivre ont des signaux très étalés et peu intenses, rendant leur observation difficile, surtout en présence d'hèmes bas spin comme dans le cas du super-complexe. Cependant, la spectroscopie visible associée à la fixation du monoxyde de carbone (CO) est une technique de choix pour l'étude des sites actifs des oxydases.

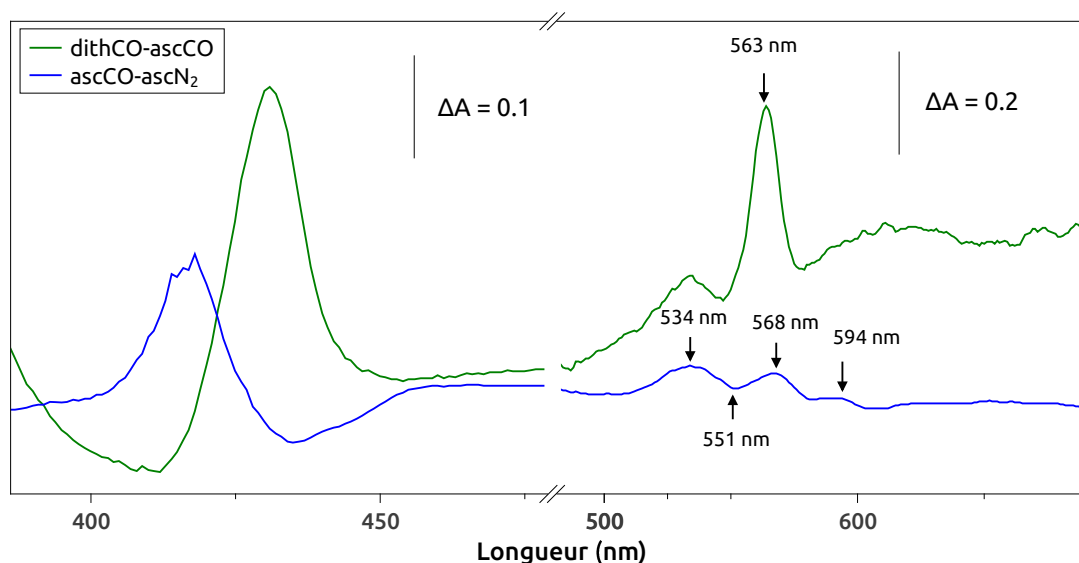


FIGURE III.37 – **Différences de spectres optiques en présence de CO.** Le super-complexe est purifié par gradient de saccharose, chromatographie échangeuse d'ions et tamis moléculaire, puis placé sous atmosphère d'argon et réduit avec 10 mM d'ascorbate. Le passage de l'échantillon en CO se fait par 2 cycles de vide et de bullage de CO. L'échantillon est ensuite réduit dans un premier temps avec 10 mM d'ascorbate, puis avec 2 mM de dithionite.

La réduction de l'oxygène en eau constitue la dernière étape de la chaîne respiratoire. L'inhibition de cette réaction par le CO est bien caractérisée au niveau moléculaire (Chance *et al.*, 1970). La CcOx *caa3* possède 5 centres redox : l'hème *c* reçoit l'électron provenant de l'oxydation du cytochrome *c*, qui passe ensuite par le centre Cu_A et l'hème *a* pour arriver au centre binucléaire hème $a_3\text{:Cu}_B$ où se déroule la réaction de réduction de l'oxygène. L' O_2 ne se lie pas à l'enzyme tant que le site actif n'est pas totalement réduit, c'est également le cas du CO, qui

est un inhibiteur compétitif se fixant au site actif de l'oxydase, mais sans entraîner de réaction d'oxydo-réduction. Il a été démontré qu'il peut également se fixer sur l'hème c_i de *C. reinhardtii* lorsque celui-ci est à l'état réduit (Barucq-Gabrielle, 2009). Lorsque le CO se lie à un hème, il modifie son spectre (cf. figure III.37).

Le complexe [CcOx-CO] a une probabilité assez faible de se dissocier spontanément, correspondant à une constante de vitesse (k_{off}) d'environ $0,02 \text{ s}^{-1}$ (Cooper et Brown, 2008), mais peut être dissocié par un flash de lumière. Le spectre d'absorption obtenu après photodissociation, éventuellement en présence d'oxygène, permet d'obtenir des renseignements sur le site actif de l'oxydase. Ce système d'activation des oxydases, imaginé et mis en œuvre par Gibson et Greenwood (1963), a été très largement appliqué et perfectionné par la suite, permettant l'élucidation de nombreux aspects du mécanisme de transfert d'électrons et de protons interne à la CcOx. L'utilisation de cette technique pour l'étude de transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire sur des cellules entières de levure *S. cerevisiae* a été l'objet de la thèse de Martin Trouillard (2011).

Spectres de photodissociation du CO sur le super-complexe

Plusieurs types de spectres sont enregistrés :

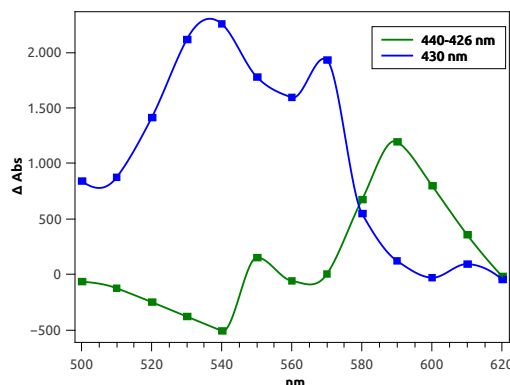
- Spectres de photodissociation du CO : l'échantillon est excité à une longueur d'onde constante (dans notre étude, $\lambda_{exc} = 595 \text{ nm}$ ou 540 nm), alors que la longueur d'onde de détection est modifiée. Ce spectre nous apporte des informations sur les espèces présentes dans l'échantillon.
- Spectres d'action : l'échantillon est excité à des longueurs d'ondes variables, alors que la détection est fixe. Ce spectre nous permet d'obtenir les λ_{exc} des différentes espèces, qui seront utilisées pour les spectres de photodissociation.

Ces expériences ont été réalisées sur des cellules entières de *G. stearothermophilus*, ainsi que sur du super-complexe purifié, en produisant des spectres de photodissociation identiques (cf. figure III.39b). Cette observation montre que le contenu en oxydase des membranes est proche du contenu en oxydase du super-complexe purifié, et donc que notre protocole de purification nous permet d'isoler un objet représentatif de l'état de la membrane bioénergétique. Si notre échantillon est hétérogène, cette hétérogénéité est déjà présente au niveau de la membrane.

Le spectre de photodissociation du CO est composé de plusieurs signaux qui se superposent. On observe au moins deux espèces qui se distinguent par des spectres d'action et de photodissociation différents. La comparaison des expériences *in vivo* et *in vitro* permet de conclure que ces deux espèces sont présentes en proportion analogue dans les deux types d'échantillons (cf. figure III.39b). La combinaison des spectres d'action et de photodissociation (cf. figure III.38b et figure III.38a) permet de distinguer deux espèces fixatrices de CO :

- Une première espèce possédant un minimum et un maximum d'absorption à 430 nm et 445 nm , lorsque $\lambda_{exc} = 595 \text{ nm}$.

Image copyright



(a) Spectres de photodissociation

(b) Spectres d'action

FIGURE III.38 – **Spectres de photo-dissociation du CO.** (a) Spectres des changements d'absorption photo-induits de l'échantillon de super-complexe purifié en présence de CO. L'échantillon est préalablement réduit à l'ascorbate pour permettre la fixation du CO. Deux longueurs d'onde d'excitation sont utilisées afin de séparer les signaux des deux composants. (b) Spectres d'action de l'échantillon de super-complexe en présence de CO. La variation d'absorption est détectée à différentes longueurs d'ondes alors que la longueur d'onde d'excitation est variable. Les spectres sont normalisés sur le signal à 445 nm en excitant à 595 nm. Le même échantillon est utilisé dans les deux expériences. La courbe verte représente la différence entre deux longueurs d'ondes, afin de maximiser la contribution de la courbe noire de la figure de gauche et de minimiser la contribution de la courbe rouge.

- Une seconde espèce excitée à 540 nm et dont la contribution présente un minimum d'absorption à 417 nm et un maximum à 435 nm.

Comparaison avec la levure

La levure *S. cerevisiae* possède une CcOx *aa3*, dont le site actif est similaire à celui de la CcOx *caa3*. La comparaison des spectres de photodissociation obtenus pour *G. stearothermophilus* avec ceux de cellules entières de levure permet l'attribution du signal excité à 595 nm au site actif de la CcOx *caa3* : l'hème *a3* et Cu_B (cf. figure III.39), mais ne permet pas d'identifier le signal supplémentaire possédant un minimum d'absorption à 420 nm.

Le CO peut-il se lier à l'hème c_i ?

Notre première hypothèse fut que cette contribution supplémentaire était due à la liaison du CO sur l'hème c_i , comme dans le cas du cytochrome b_6f . A première vue, cela semble pourtant peu probable, car le CO se fixe sur les hèmes haut spin dans leur état réduit. L'expérience étant réalisée en présence d'ascorbate, l'hème c_i ne devrait pas être réduit d'après son potentiel redox (cf. III.4). Cependant, l'état d'oxydo-réduction de l'hème c_i correspond à un équilibre dynamique $c_{i-oxydé} \rightleftharpoons c_{i-réduit}$, dont la concentration de chaque espèce dépend du potentiel redox ambiant. Or, dans le cytochrome b_6f , le CO déplace le potentiel redox apparent de c_i vers des valeurs plus positives. Dans ce cas, on pourrait observer la formation spontanée de complexes

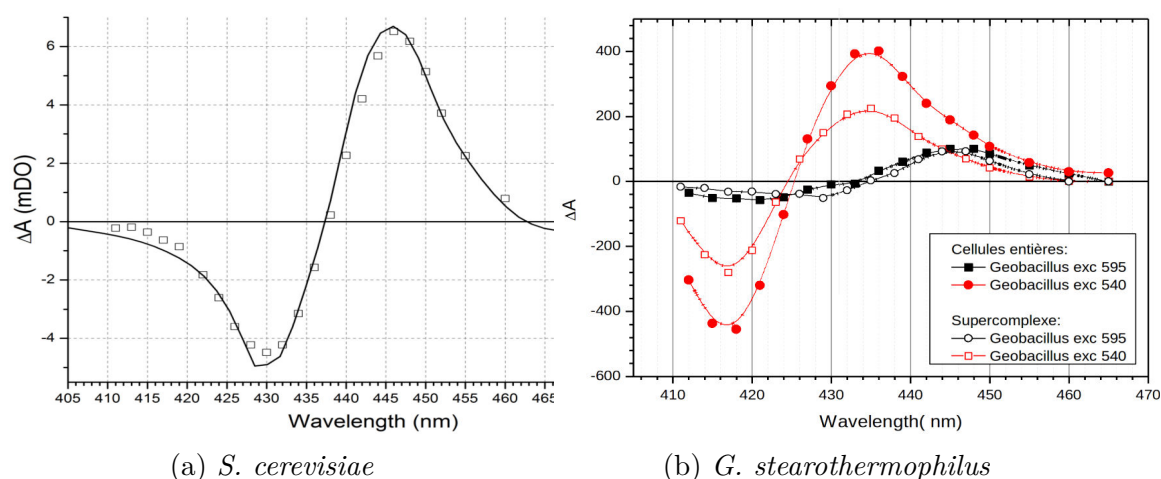


FIGURE III.39 – **Spectres des changements d'absorption photo-induits en présence de CO.** (a) Photodissociation du CO sur cellules entières de levure *S. cerevisiae* en excitant à 595 nm, d'après Trouillard *et al.* (2011). (b) Spectres de cellules entières et de super-complexe purifié de *G. stearothermophilus*. Les spectres sont normalisés sur le signal à 445 nm en excitant à 595 nm

c_i -CO en présence d'ascorbate.

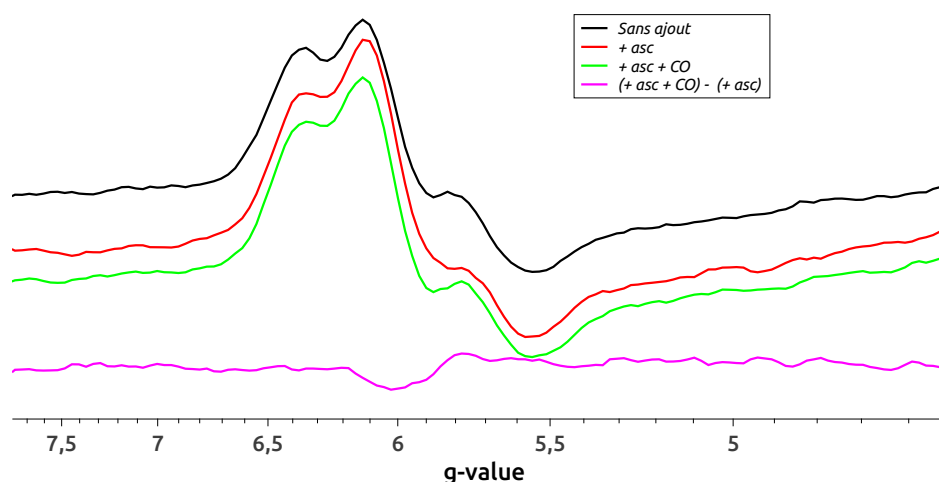


FIGURE III.40 – **Spectres RPE de l'hème c_i en présence de CO** Les spectres sont enregistrés sous une atmosphère d'argon car la présence de l'oxygène peut influencer sur le spectre. Courbe noire : sans ajout ; courbe rouge : avec ascorbate ; courbe verte : avec ascorbate et CO ; courbe rose : différence de spectre (ascorbate+CO) - ascorbate. Température d'enregistrement : 15K. Atténuation des micro-ondes : 64 mW.

Deux approches ont été utilisées pour tester cette hypothèse :

1. **Le signal de l'hème c_i a été observé par RPE** (cf. figure III.40). Un signal est observé lorsque l'hème est oxydé, puis disparaît lors de la réduction. Donc en cas de réduction d'une partie de la population de c_i , on devrait observer une diminution du signal. Or il apparaît que l'ajout de CO sur le super-complexe réduit à l'ascorbate sous une atmosphère d'argon ne change pas le spectre de c_i .

2. **Des spectres de photo-dissociation ont été enregistrés à différents états d'oxydo-réduction.** En présence d'un réducteur faible, l'ascorbate, on s'attend dans ce cas à avoir une majorité de la population d'hèmes c_i sous forme oxydée. Puis en présence d'un réducteur plus fort, le dithionite, on s'attend alors à avoir une majorité de la population d'hèmes c_i sous forme réduite. La similitude des spectres obtenus en ascorbate et dithionite suggère que la contribution excitée à 540 nm fixe le CO en ascorbate aussi bien qu'en dithionite. Cela implique un déplacement du potentiel redox apparent de l'hème c_i considérable. Or on peut exclure cette hypothèse car les spectre RPE en ascorbate montrent que l'on ne perd pas de signal de l'hème c_i en présence de CO.

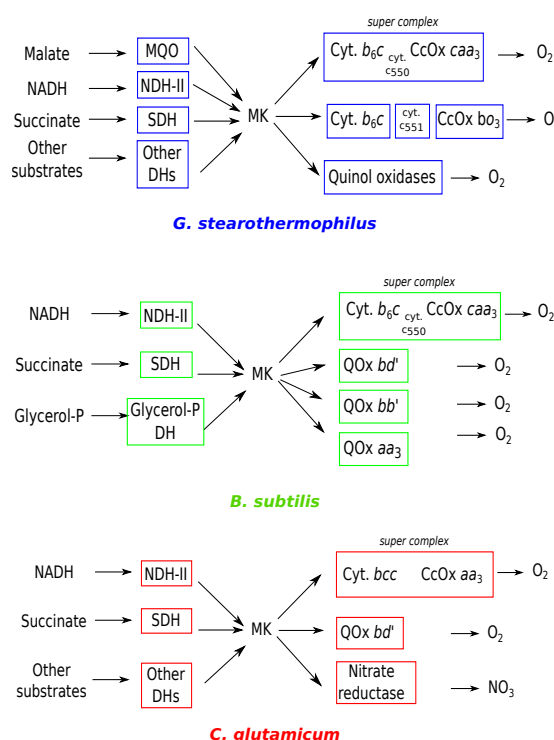


FIGURE III.41 – **Comparaison des chaînes respiratoires de *G. stearothermophilus*, *B. subtilis* et *C. glutamicum*.** *G. stearothermophilus* possède un hème c_i et deux CcOx : la caa_3 et la bo_3 , pouvant fixer le CO. *C. glutamicum* contient un cytochrome bcc , donc ne possède pas d'hème c_i . *B. subtilis* lui possède l'hème c_i , mais ne contient pas de CcOx bo_3 . Schémas adaptés d'après Kabashima *et al.* (2012), Azarkina *et al.* (1999) et Bott et Niebisch (2003).

Pour exclure totalement l'hème c_i , les mêmes expériences de photodissociation du CO ont été réalisées sur deux autres organismes possédant des chaînes respiratoires légèrement différentes de celle de *G. stearothermophilus* : *Corynebacterium glutamicum* et *Bacillus subtilis*. La figure III.41 présente leurs chaînes respiratoires et leurs particularités par rapport à celle de *Geobacillus*. Les trois organismes possèdent une oxydase de type $(c)aa_3$ avec des sites actifs similaires. *B. subtilis* n'a pas de CcOx bo_3 , mais possède un hème c_i au sein du cytochrome b_6c . *C. glutamicum* lui ne possède ni CcOx bo_3 ni hème c_i .

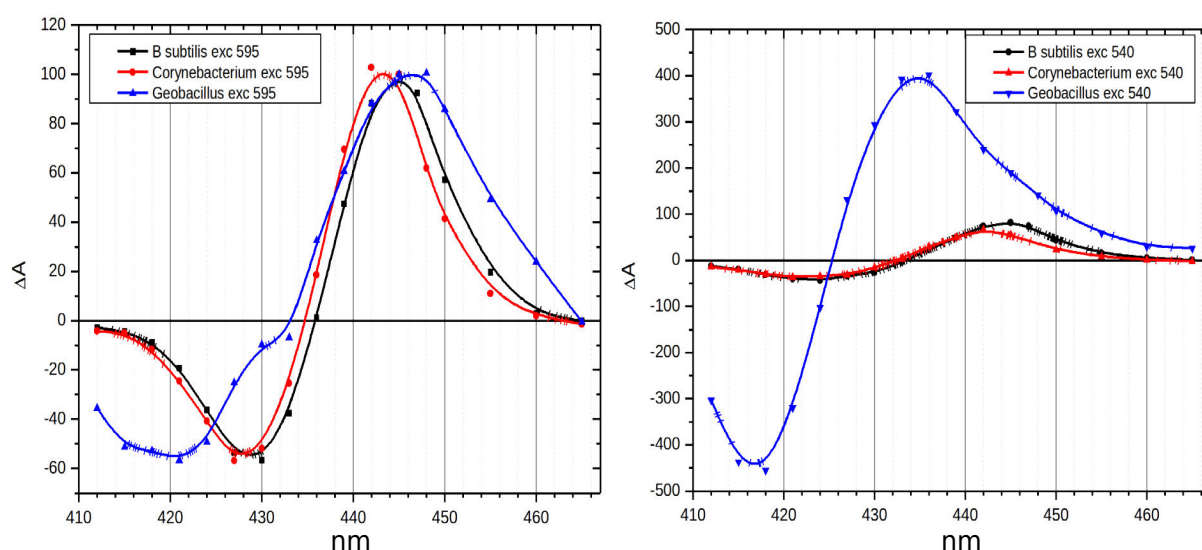


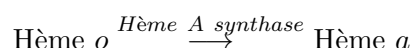
FIGURE III.42 – Spectres des changements d’absorption photo-induits en présence de CO de cellules entières de différents organismes. Les spectres sont normalisés sur le signal à 445 nm en excitant à 595 nm.

La figure III.42 présente les spectres des changements d’absorption photo-induits en présence de CO sur des cellules entières pour les trois organismes, à $\lambda_{exc} = 595$ nm (pour le site actif hème a_3/Cu_B) et $\lambda_{exc} = 540$ nm (pour la contribution supplémentaire présente chez *G. stercorophilus*). *C. glutamicum* et *B. subtilis* présentent tous deux des spectres similaires à celui de *S. cerevisiae*, et ne possèdent pas de contribution à 420 nm. Le spectre obtenu pour ces organismes pour $\lambda_{exc} = 540$ nm correspond à la contribution résiduelle du signal du site actif de l’oxydase, en accord avec le spectre d’action (cf. figure III.38b). Le signal supplémentaire n’est donc probablement pas dû à l’hème c_i .

Présence d’un hème de type *o* dans l’échantillon

Des différences de spectre de super-complexe purifié réduit en ascorbate sous argon ou sous atmosphère de CO montrent deux pics (cf. figure III.37) : à 534 nm et 568 nm, correspondant à la signature d’un hème de type *o* (Sone et Fujiwara, 1991a).

Il a été observé par Sone et Fujiwara (1991b), dans le cas de la bactérie *Bacillus sp. PS3* qu’une condition d’oxygénation un peu faible peut empêcher une transformation complète des hèmes *o* en hèmes *a*.



En effet l’Hème A synthase catalyse la conversion d’un groupe méthyle de l’hème *o* en groupe formyle à l’aide d’une molécule d’oxygène (cf. figure III.43). En cas de légère baisse de la $p\text{O}_2$, la transformation de l’hème *o* en hème *a* peut être limitée, et entraîner la présence d’une population de cytochrome oxydase cao_3 . L’unique différence attendue entre ces deux enzymes $\text{ca}(o/a)_3$ est la nature de l’hème haut spin du site actif. On peut alors se demander pourquoi uniquement

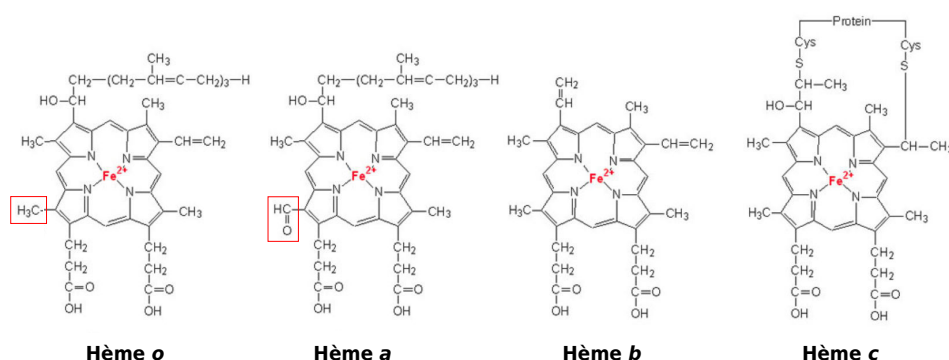


FIGURE III.43 – Structures de différents types d'hèmes.

l'hème du site actif est transformé en hème *o*. On pourrait en effet s'attendre à observer également des cytochromes *c* oxydases *coo*₃, mais aucuns hèmes *o* bas spin n'ont été visualisés en spectroscopie visible ou au moment des titrations redox.

Une hypothèse peut être formulée en analysant la structure de la CcOx *caa*₃ de *Thermus thermophilus* (Lyons *et al.*, 2012). La substitution d'un hème *a* (*a*₃) par un hème *o* (*o*₃) au niveau du site actif ne devrait pas modifier l'environnement du site, car le groupe formyle ne semble pas être engagé dans une interaction avec la protéine. Cependant, dans le cas de l'hème *a* de la sous-unité I, son remplacement par un hème de type *o* entraîne la perte d'un pont hydrogène qui participe à la stabilisation de l'hème (cf. figure III.44).

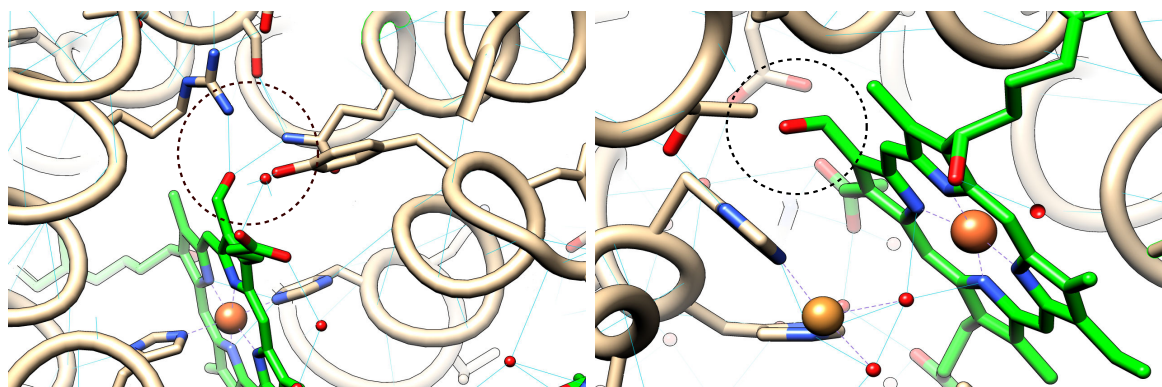


FIGURE III.44 – Hèmes *a* et *a*₃ dans la structure de la CcOx *caa*₃ de *Thermus thermophilus*. Le cercle en pointillés localise le groupe formyle de l'hème *a*. **Gauche** : hème *a*. **Droite** : hème *a*₃. Les ponts hydrogènes potentiels sont représentés en bleu. Modèle PDB : 2YEV.

Il est difficile d'estimer en quelles proportions sont présentes les deux populations car les coefficients d'extinction moléculaires (ϵ) des deux hèmes ne sont pas connus. Cette hétérogénéité ne pose pas de problèmes particuliers pour la purification ou pour les études structurales, tant qu'on ne cherche pas à étudier le site de fixation de l'oxygène. Dans le cas de la titration, nous sommes dans l'incapacité de titrer le site actif de l'oxydase (cf. III.4), donc cette hétérogénéité

ne présente pas de problèmes dans ce cas de figure.

III.4 Titration redox des cofacteurs

Les chaînes de transfert d'électrons (CTE) bioénergétiques transportent les électrons d'un couple donneur à un couple accepteur. Suivant les organismes et les milieux de vie, il existe une grande diversité de couples redox utilisés, entraînant des différences au niveau de l'ajustement des cofacteurs redox au sein des complexes composant les chaînes, ainsi qu'au niveau de la stœchiométrie de protons transloqués à travers la membrane par électron transféré. De plus, toutes les chaînes de transfert n'utilisent pas le même type de quinones pour transporter les électrons au sein de la membrane. Une observation simpliste consisterait à dire que les CTE anaérobies utilisent des quinones à bas potentiels (les ménaquinones), alors que les CTE aérobies utiliseraient des quinones à haut potentiel (ubiquinone, plastoquinone et caldariellaquinone), en raison de leur différence de stabilité en présence d'oxygène. Cependant certains organismes comme *G. stearothermophilus* possèdent des chaînes respiratoires aérobies utilisant des ménaquinones. Nous avons cherché à comprendre comment de telles chaînes peuvent fonctionner et quelles sont leurs différences par rapport à des chaînes respiratoires fonctionnant avec les mêmes couples donneurs et accepteurs d'électrons (NADH/NAD^+ ; $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$) associés à des ubiquinones.

Dans cette perspective, la détermination du potentiel redox des cofacteurs du super-complexe suivie de leur comparaison avec les données présentes dans la littérature pour d'autres complexes bioénergétiques, nous semble une approche intéressante pour étudier la régulation des transferts d'électrons au sein de la chaîne respiratoire de *G. stearothermophilus*. La spectroscopie visible et RPE permettent d'effectuer la titration des cofacteurs et d'en déduire leurs potentiels redox à l'équilibre. Il est important de garder à l'esprit que les potentiels redox à l'équilibre peuvent être assez différents des potentiels redox réels lors du fonctionnement de l'enzyme, mais ils procurent une base pour la réflexion.

Les potentiels redox des hèmes bas spin et de l'hème c_i ont été déterminés par titration électrochimique couplée à la spectroscopie optique, alors que le centre Fer-Souffre de la protéine de Rieske et l'hème c_i ont été déterminés par titration chimique associée à la spectroscopie RPE. La figure III.45 montre la déconvolution des différents spectres.

La réduction de l'hème a , suivie à 605 nm, est parfaitement réversible. Deux vagues d'amplitudes semblables peuvent être observées à +150 mV et +320 mV avec des pics d'absorption des bandes α à 606 nm et 604 nm respectivement. Celles-ci peuvent être attribuées à l'hème a en interaction avec l'hème haut spin a_3 et Cu_B du site actif de l'oxydase (Hellwig *et al.*, 1999).

Les deux hèmes b ont des potentiels redox $E_{o,pH7}$ de -360 mV et -220 mV avec des pics d'absorption des bandes α à 564 nm et 561 nm pour les hèmes b_H et b_L respectivement, avec

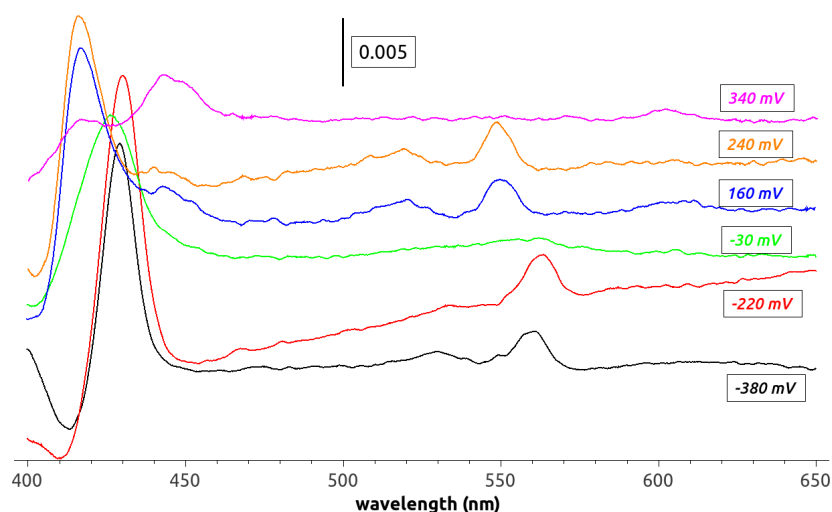


FIGURE III.45 – Déconvolution des différences de spectres, en utilisant les potentiels redox déterminés par titration.

une amplitude un peu plus faible pour l'hème b_L . Ces potentiels redox sont plus bas que tous ceux publiés pour des hèmes b de complexes Rieske/cyt b . Ils sont notamment plus bas que ceux déterminés par Kutoh et Sone (1988) pour le cytochrome b_6c de *Bacillus sp. PS3*, avec des valeurs de -190 mV et -130 mV pour les hèmes b_L et b_H ; la valeur de b_L n'est pas très éloignée de celle mesurée pour les complexes à ubiquinone. Les raisons de ces différences ne sont pas claires. Cependant, les titrations n'ont pas été effectuées à des valeurs de potentiel aussi basses que les nôtres. De plus, la purification a été réalisée en Triton, qui a déjà posé des problèmes lors de titrations avec d'autres complexes (Hurt et Hauska, 1982). Pour vérifier que notre protocole de purification n'altère pas les valeurs des potentiels redox des hèmes b , nous avons répété nos titrations sur des membranes de *Geobacillus stearothermophilus*. Pour ce faire nous avons adapté la procédure de la cellule de titration électrochimique pour les membranes en utilisant un trajet optique de 30 μm . Les titrations ont permis de retrouver les valeurs de -220 mV et -340 mV attribuées à b_H et b_L , confirmant ainsi les valeurs trouvées sur les super-complexes isolés. Le tableau III.5 récapitule les différentes titrations effectués durant ce travail.

Une autre étude récente a été réalisée sur la bactérie *Corynebacterium glutamicum* qui possède un super-complexe similaire à celui de *G. stearothermophilus*, mais avec des différences notables comme l'absence d'hème c_i , le complexe bc étant plus proche des cytochrome bc_1 . Les valeurs déterminées dans cette titration sont -163 mV pour l'hème b_H et -292 mV pour l'hème b_L (?). Ces valeurs ne sont pas aussi basses que les nôtres mais elles vont dans la même direction. Une observation similaire peut être faite entre le cytochrome b_6f de *C. reinhardtii* et le cytochrome bc_1 de *R. capsulatus*. Ce décalage des potentiels redox de la chaîne bas potentiel des complexes Rieske/ b pourrait être dû à la présence de l'hème c_i .

La bactérie photosynthétique *Heliobacillus mobilis* utilise également les ménaquinones. La

Titration	nombre d'expériences	Conclusion
No add	3	Les résultats sont très proches d'une expérience à l'autre.
NQNO	1	L'ajout de NQNO ne modifie pas les potentiels des cofacteurs redox, contrairement au cytochrome b_6f , où le NQNO se lie au fer de l'hème c_i et décale son potentiel redox de -225 mV (Alric <i>et al.</i> , 2005).
pH 9	1	A pH 9, les potentiels redox des hèmes restent identiques, sauf pour l'hème c_i qui subit un décalage de 60 mV par unité de pH.
Membranes	2*	Les potentiels redox déterminés sur membranes sont identiques à ceux déterminés pour le super-complexe purifié. Ce résultat permet de valider nos potentiels mesurés pour les hèmes b, et montre que nos conditions de purification n'interfèrent pas avec la titration électrochimique.
CO	1	La présence d'un hème o est observée au niveau des spectres concentrés, mais les signaux obtenus en titration sont trop faibles pour déterminer un potentiel redox. L'oxydation et la réduction ne sont pas superposables, il y a donc une hystérésis : l'oxydation a des potentiels plus positifs que la réduction. Cette hystérésis est due à un temps d'équilibration trop court. En effet, l'ajout de CO découple le site actif et ralentit énormément l'équilibration des potentiels (Petra Hellwig, communication personnelle).

TABLE III.5 – **Titrations électrochimiques du super-complexe.** * Une titration chimique (avec ajout de réducteurs et d'oxydants), et une titration électrochimique (avec la cellule électrochimique) sur membranes. Titration en présence de CO : l'échantillon est mis sous CO par plusieurs cycles de vide-bullage de CO, puis la cellule électrochimique (au préalable passée en CO) est remplie avec l'échantillon.

titration de ses cofacteurs avait révélé des valeurs de -190 mV pour l'hème b_L et -90 mV pour l'hème b_H , proches de celles des complexes utilisant des quinones haut potentiel (le tableau IV.3 récapitule les données obtenus pour *Geobacillus stearothermophilus* et les compare avec d'autres données de la littérature). Lors de cette étude, aucune mesure en dessous de -290 mV n'avait été effectuée, dénotant un présupposé tacite mais non justifié, que les potentiels de hèmes b de tous les complexes Rieske/cyt b devraient avoir les mêmes valeurs. Les résultats de *Geobacillus stearothermophilus* ont incité à refaire ces titrations, qui ont donné des valeurs de -320 mV et -190 mV, très proches de *G. stearothermophilus* (Frauke Baymann, communication personnelle).

Il devient donc raisonnable d'affirmer que les complexe Rieske/cyt b qui utilisent des ménaquinones, affichent des potentiels redox pour les hèmes b significativement plus bas que ceux des complexes à ubiquinones ou plastoquinones. Les titrations redox effectués à pH 7 et pH 9 sur des super-complexes purifiés donnent des valeurs similaires pour les hèmes b . C'est une caractéristique déjà observée pour les autres complexes Rieske/cyt b .

La titration des trois hèmes c correspondant au complexe cytochrome b_6c , au cytochrome c_{550} et à la cytochrome c oxydase caa_3 donne des valeurs trop proches pour pouvoir les distin-

guer d'une manière fiable, leurs potentiels redox se situent entre +160 mV et +240 mV. C'est un résultat compatible avec la valeur de +225 mV publiée pour le cytochrome c_{551} de *Bacillus p. PS3* (Fujiwara *et al.* (1993)).

La titration du cluster FES de la protéine de Rieske a été réalisé par RPE (cf figure III.46). Les signaux g_x et g_y titrent à la même valeur avec un potentiel de +200 mV. Elle est proche de celle déterminée pour le même cluster chez *Bacillus subtilis* (Liebl *et al.*, 1992) et en accord avec la présence d'une glycine et d'une tyrosine au voisinage du cluster qui caractérise les protéines de Rieske à bas potentiel (Duval *et al.*, 2010).

Le Cu_A de la cytochrome c oxydase caa_3 peut-être observé dans les spectres RPE du supercomplexe oxydé, mais son signal est superposé à des contributions du signal g_x du FES de la protéine de Rieske et ceux des hèmes c empêchant ainsi une détermination de son potentiel redox. Cependant, si nous pouvons suivre son signal jusque vers +200 mV, il n'est plus visible pour des potentiels supérieurs. Ceci suggère un potentiel redox proche de +200 mV.

Le site actif de la cytochrome c oxydase contient l'hème a_3 à spin haut et le groupe Cu_B , qui ne peuvent pas être observés directement par spectroscopie optique car leurs signaux sont trop faibles, ou par RPE à cause du couplage de spin entre l'hème a_3 et Cu_B . Cependant, les deux vagues de la titration optique de l'hème a , générées par l'interaction avec le site actif, procurent une information sur l'équilibre de potentiels redox qui caractérise les oxydases Cu-hèmes.

Les colorations aux TMBZ des hèmes dans les gels SDS ont déjà confirmé la présence de l'hème c_i dans le site Q_i du complexe cytochrome b_6c . La titration permet de déconvoluer les spectres d'une manière analogue à celle réalisée pour le cytochrome cytochrome b_6f (Alric *et al.*, 2005). La déconvolution des spectres révèle une contribution avec un pic à 430 nm dans la région de Soret. La titration par spectroscopie optique détermine un potentiel redox de -30mV à pH 7 tandis que la titration RPE donne une valeur proche, -50 mV à pH 7 (cf figure III.46).

La titration par électrochimie à pH 9 permet de déterminer un potentiel redox de -120 mV pour l'hème c_i . Cette dépendance au pH qui contraste avec les hèmes b avaient déjà été observée avec une pente similaire dans le cytochrome cytochrome b_6f (Alric *et al.*, 2005).

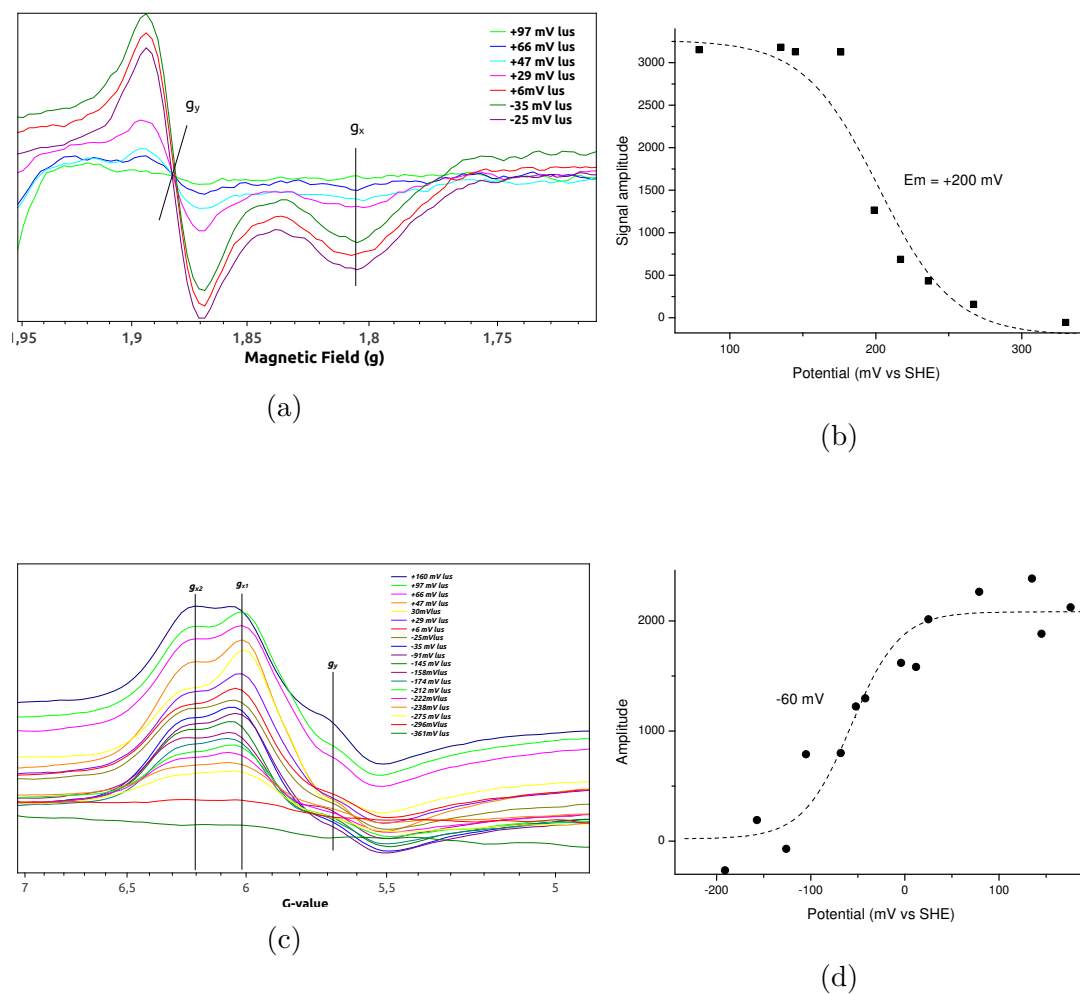


FIGURE III.46 – **Titration RPE de l'hème c_i et de la protéine de Rieske.** Titration par RPE du centre FES de la protéine de Rieske (a et b), et de l'hème c_i (c et d). Pour plus de clarté, tous les spectres ne sont pas représentés sur les figures. (a) Spectres enregistrés à 15 K, 6,4 mW. (b) Courbe des variations d'amplitude du signal g_y de la Rieske en fonction du potentiel redox, ajustée par une courbe de Nernst. (c). Spectres enregistrés à 5 K, 64 mW. d Courbe des variations d'amplitude du signal g_{x2} de l'hème c_i en fonction du potentiel redox, ajustée par une courbe de Nernst.

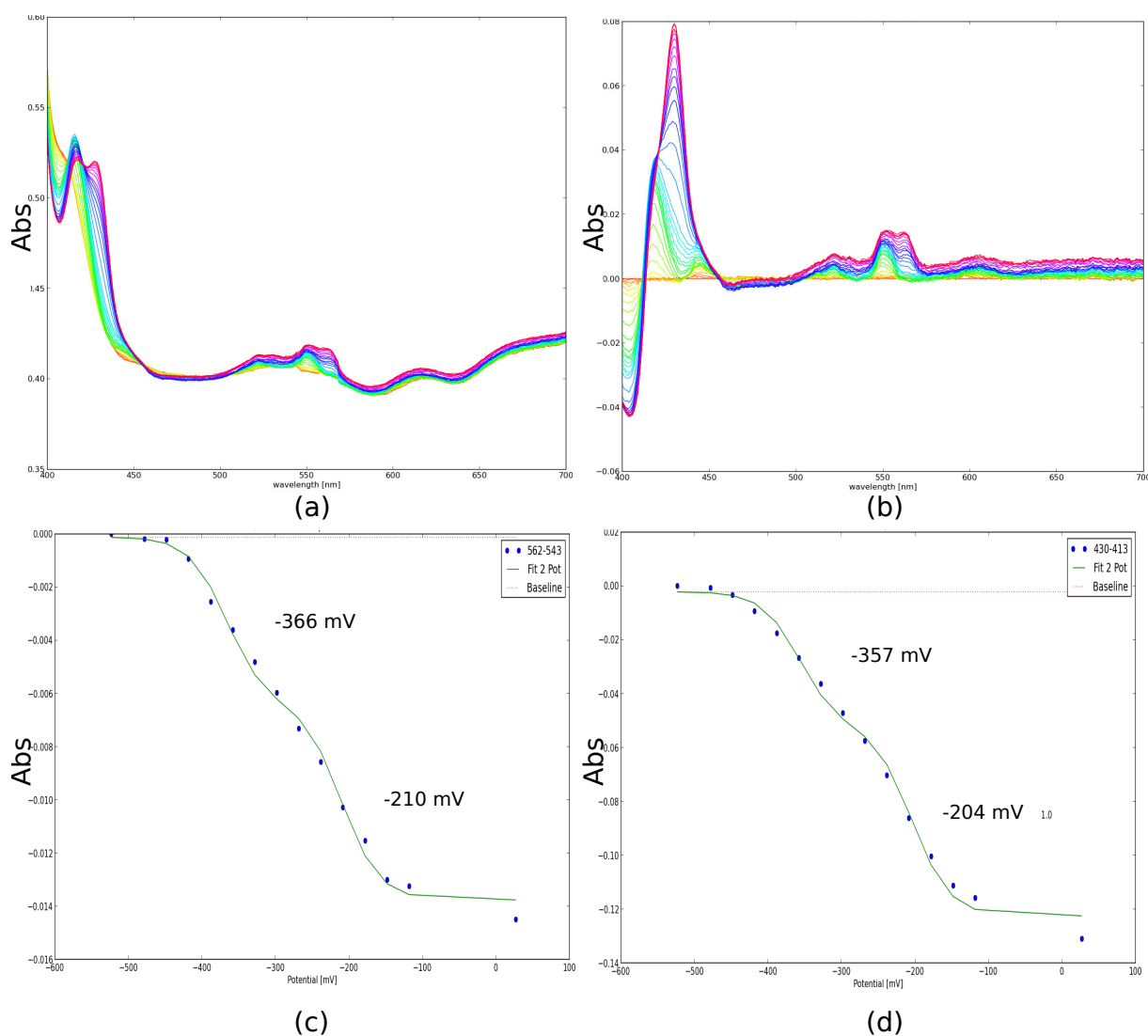


FIGURE III.47 – **Suivi par spectroscopie optique d’une titration électrochimique.** (a) Spectres enregistrés à différents potentiels redox imposés. (b) Différences de spectre obtenus après soustraction du premier spectre à tous les autres. (c). Courbe des variations d’amplitude en fonction du potentiel redox, entre les longueurs d’ondes 563-542 nm (bande α des hèmes b), (d) et 430-413 nm (contribution des hèmes b dans la bande de Soret). Les deux courbes sont ajustées par une équation de Nernst, et les potentiels redox en sont déduits.

IV Discussion

IV.1 Diversité des oxydases	145
IV.2 L'isolement d'un super-complexe respiratoire	146
IV.2.1 Le(s) super-complexe(s) de <i>G. stearothermophilus</i>	146
IV.2.2 Le(s) super-complexe(s) purifié(s)	147
IV.3 Caractérisation de l'hème c_i	153
IV.4 Les transferts d'électrons dans une chaîne respiratoire à ménaquinone	155
IV.4.1 Un décalage des potentiels redox	156
IV.4.2 Le Q-cycle et les ménaquinones	158
IV.5 Perspectives	160

Ce travail de thèse a marqué le point de départ de l'étude d'un super-complexe au laboratoire. Notre approche est un peu différente des approches habituellement rencontrées dans la littérature, car notre objectif est la cristallisation du super-complexe. Pour cela, un protocole d'expression et de purification a été mis en place, permettant l'isolement d'un super-complexe composé du cytochrome b_6c , du cytochrome c_{550} et de la CcOx caa_3 . Ce super-complexe a été utilisé pour étudier les potentiels redox au sein d'une chaîne respiratoire aérobie utilisant des quinones à bas potentiel.

IV.1 Diversité des oxydases

Comme de nombreux procaryotes, *Geobacillus stearothermophilus* possède une chaîne respiratoire modulable. La combinaison d'enzymes impliquées dans la chaîne de transfert détermine le ratio H^+/O de la cellule, et par conséquent l'énergie libre disponible pour la cellule (Sone *et al.*, 1999), lui permettant d'adapter son métabolisme à différents environnements. *G. stearothermophilus*, comme la plupart des autres bactéries est capable de réguler l'expression de ses oxydases terminales en fonction des conditions d'oxygénation. Par exemple *C. glutamicum* détermine l'expression des deux oxydases terminales, CcOx aa_3 et qOx bd en fonction de la pO_2 (Bott et Niebisch, 2003), ou *Mycobacterium smegmatis* où l'expression de la CcOx bd augmente d'un facteur 4 en conditions microaérobies (Kana *et al.*, 2001). Le changement d'expression des oxydases en fonction des conditions du milieu est un processus rapide : chez *Bacillus sp. PS3*, la transition entre la CcOx caa_3 et la CcOx bo_3 est réalisée en moins d'une heure (Sone *et al.*, 1983).

La baisse de la pression d'oxygène durant la croissance de *G. stearothermophilus* peut entraîner une hétérogénéité de l'échantillon en oxydases terminales. L'utilisation de fermenteurs avec un contrôle de la pO_2 permet de favoriser l'expression d'un super-complexe entre le cytochrome b_6c , le cytochrome c_{550} et la CcOx caa_3 .

Il est difficile de maintenir une pO_2 élevée à 55°C, et une hétérogénéité peut être observée au niveau de l'hème haut spin du site actif de l'oxydase, où l'hème a_3 peut être remplacé par un hème o_3 . Il semble donc qu'à haute pO_2 , la CcOx caa_3 soit exprimée. Quand la concentration d'oxygène baisse, une population de CcOx cao_3 est produite, qui ne se différencie de la caa_3 que par la nature de l'hème haut spin du site actif. Lorsque la quantité d'oxygène diminue de nouveau, la CcOx bo_3 prend le relais. Les oxydases $ca(a/o)_3$ appartiennent au groupe des SoxM et possèdent une faible affinité pour l'oxygène, à la différence de la bo_3 , qui est une SoxB avec une haute affinité (cf. I.1.5).

Nos expériences de spectrométrie de masse, spectroscopie visible et photo-dissociation du CO n'ont pas permis de détecter d'indices de la présence de qOx (quinol Oxydases) dans nos échantillons. Il est cependant possible que certaines de ces enzymes soient présentes en faible quantité.

IV.2 L'isolement d'un super-complexe respiratoire

Le travail principal de cette thèse a été l'isolement d'un super-complexe respiratoire à partir des membranes de *Geobacillus stearothermophilus*. La mise en place du protocole de purification s'est faite par étapes successives, en utilisant différents détergents et différentes techniques de séparation des protéines, nous permettant d'obtenir un échantillon purifié et stable, contenant les trois composants connus du super-complexe : le cytochrome b_6c , le cytochrome c_{550} et la cytochrome c oxydase caa_3 . La question de l'homogénéité de l'échantillon ainsi que son état oligomérique restent encore à déterminer, et semblent dépendre des conditions de purifications.

IV.2.1 Le(s) super-complexe(s) de *G. stearothermophilus*

La grande majorité des résultats publiés sur les super-complexes sont des études de la composition des membranes par la technique de BN-(Blue Native) ou CN-(Clear Native) PAGE, mise au point par Schägger et von Jagow (1991). Des études sur l'organisation des complexes respiratoires au sein des membranes de nombreuses bactéries, comme *Bacillus subtilis* (García Montes de Oca *et al.*, 2012) ou *Parococcus denitrificans* (Stroh *et al.*, 2004) montrent une large variété de super-complexes. La composition en super-complexes des membranes solubilisées dépend fortement des conditions de solubilisation. Dans la plupart de ces études, les membranes sont solubilisées avec un détergent "doux", la digitonine, dont les molécules interfèrent moins avec les interactions qui stabilisent les super-complexes que d'autres détergents. La digitonine

n'a pas été utilisée lors de cette étude pour plusieurs raisons :

1. Ce détergent n'a pour l'instant jamais pu être utilisé en cristallographie. L'objectif de cette étude étant la résolution de la structure d'un super-complexe par cristallographie aux rayons X, il est préférable de commencer directement à travailler avec un détergent compatible.
2. La digitonine solubilise les membranes en entraînant l'apparition de plusieurs populations de super-complexes, et crée ainsi une polydispersité avec des assemblages plus ou moins stables.

Il est difficile de savoir si le super-complexe purifié correspond au système dans son état physiologique au sein de la membrane. De récentes études par microscopie électronique et tomographie commencent à fournir quelques informations sur les assemblages supra-moléculaires au sein des membranes (Davies *et al.*, 2011), mais ces données sont encore préliminaires, et aucune étude n'a été faite sur *Geobacillus stearothermophilus*. Nous n'avons pas la capacité de savoir si la membrane contient de nombreux assemblages supra-moléculaires différents, ou si ce sont nos conditions d'extraction qui créent l'hétérogénéité observée. En effet, la membrane pourrait contenir un gros super-complexe respiratoire, avec des protéines faiblement associées, et les conditions de solubilisation pourraient produire plusieurs populations, plus ou moins dissociées. Nous cherchons à isoler un objet stable et homogène, ce qui n'est pas forcément le cas du ou des super-complexes à l'état natif dans la membrane.

IV.2.2 Le(s) super-complexe(s) purifié(s)

Stœchiométrie d'organisation et état oligomérique

La composition du super-complexe purifié depuis les membranes de la bactérie *Geobacillus stearothermophilus* a été étudiée par migration sur gel SDS-PAGE et spectrométrie de masse, révélant la présence du cytochrome b_6c , du cytochrome c_{550} et de la cytochrome c oxydase caa_3 . Il est possible que cet assemblage supra-moléculaire contienne des sous-unités supplémentaires, mais qui sont sous-stœchiométriques par rapport aux composants principaux dans l'échantillon purifié. Chez *C. glutamicum*, la migration du super-complexe cyt $bcc:Cox aa_3$ sur gel SDS-PAGE montre la présence de sous-unités supplémentaires colorées à la même intensité que celles attendues pour le super-complexe (un gel de ce super-complexe est présenté au sein du tableau IV.1), donc vraisemblablement présentes à des niveaux stœchiométriques, qui font probablement parti de l'assemblage supra-moléculaire, d'après Richers S (2008). Une étude plus précise de la composition en sous-unité du super-complexe de *G. stearothermophilus* n'a pas été menée durant cette thèse, car la purification n'était pas à un stade assez avancé pour cela, mais c'est une des perspectives du projet.

Plusieurs super-complexes respiratoires ont été étudiés, révélant des contenus en enzymes et des stœchiométries variables. Par exemple, celui des mitochondries de cœur de bœuf est composé d'un complexe NDH I (complexe I), d'un dimère de cytochrome bc_1 (complexe III) et d'une

CcOx *aa3* ($I_1III_2V_1$) (Althoff *et al.*, 2011; Dudkina *et al.*, 2011), alors que celui des mitochondries de levure *S. cerevisiae* est un assemblage III_2V_2 (Mileykovskaya *et al.*, 2012) (cf. figure I.16). Le super-complexe isolé avec notre protocole de purification pourrait n'être qu'une partie d'un assemblage supra-moléculaire plus grand, qui pourrait éventuellement contenir les déshydrogénases NDH-II et Sdh, mais probablement pas de NDH-I (homologue du complexe I). En effet, *Geobacillus stearothermophilus* contient toutes les sous-unités de la NDH-I, sauf la sous-unité NADH-déshydrogénase. Donc soit cette NDH-I possède une autre sous-unité en charge de cette fonction, soit ce complexe a un autre rôle dans la cellule que l'oxydation du NADH. Il est ainsi possible que la Sdh, retrouvée pendant la purification, participe au super-complexe dans la membrane mais soit perdue durant le processus de purification. Cependant, si cette dissociation a lieu, c'est à une étape précoce de la purification, par exemple durant la solubilisation, car les pics de super-complexe et de Sdh sont parfaitement différenciés sur la colonne Mono Q, et le pic de super-complexe ne contient pas de Sdh résiduelle. Enfin, aucuns signaux de Sdh ou NDH-I ne sont retrouvés en RPE sur le super-complexe purifié.

• Hypothèses sur la stœchiométrie du super-complexe

La stœchiométrie d'assemblage peut être étudiée par des méthodes telles que la quantification sur gels SDS-PAGE, qui permet d'observer l'intensité des différentes bandes, ou la spectroscopie visible, qui à partir des calculs de concentrations en hèmes permet de définir des ratios entre les différents cofacteurs. Cependant, ces méthodes sont peu précises. Certaines sous-unités se colorent mieux que d'autres au bleu de Coomassie, et certaines bandes sont superposées sur le gel. La détermination des coefficients d'extinction molaire ε de chaque hème reste approximative. Ce paramètre et l'hétérogénéité existant au sein du site actif de la CcOx *caa3* rendent nos spectres difficiles à interpréter. La question de l'état oligomérique peut être appréhendée par la chromatographie d'exclusion de taille, les gels natifs ou la microscopie électronique.

La quantification des bandes sur gel après une coloration au bleu de Coomassie permet de trouver des rapports à peu près stœchiométriques entre les sous-unités I et II (CtaC et CtaD) de l'oxydase et la sous-unité IV-*c* (QcrC) du cytochrome *b₆c*. Pour les autres sous-unités, les résultats sont moins fiables en raison de superpositions et d'incertitudes sur l'attribution des bandes.

Les mesures de spectres visibles effectuées durant cette thèse n'ont pas permis de déterminer une stœchiométrie précise des hèmes, et donc ne permettent pas de remonter à une description précise de l'organisation du super-complexe. On observe surtout des variations au niveau du signal des hèmes *a*, autour de 600 nm. La comparaison de spectres provenant de plusieurs super-complexes formés par les complexes Rieske/*b* et CcOx permet d'observer des différences dans l'amplitude de ces pics, présentées dans le tableau IV.1. Les gels SDS-PAGE de chaque échantillon permettent d'avoir une idée approximative du contenu en complexes Rieske/*b* et

CcOx. Chez *B. subtilis*, une étiquette 6-His a été insérée à l'extrémité C-terminale du gène QcrC, afin de purifier le cytochrome b_6c . La purification sur colonne de nickel entraîne la co-purification du super-complexe et du cytochrome b_6c isolé, changeant ainsi les ratios des hèmes. Même avec un rapport sous-stœchiométrique en oxydase, le spectre du super-complexe de *B. subtilis* possède un pic à 604 nm plus grand que celui de *G. stearothermophilus*. Cette plus forte intensité se retrouve également chez *C. glutamicum*, qui lui possède une quantité stœchiométrique de Rieske/ b et d'oxydase.

Les super-complexes de *Paracoccus denitrificans*, *Bacillus sp. PS3* et *G. stearothermophilus* ont tous trois un spectre avec une bande d'hèmes a plus faible,

1. soit en raison de différences de stœchiométrie d'assemblage des complexes Rieske/ b et oxydases, avec d'un côté les super-complexes de *C. glutamicum* et *B. subtilis*, et de l'autre ceux de *P. denitrificans*, *Bacillus sp. PS3* et *G. stearothermophilus*.
2. soit car les propriétés spectrales des cofacteurs sont différentes chez certains de ces super-complexes.

Ces deux hypothèses combinées pourraient contribuer à expliquer nos résultats. En effet, la purification du super-complexe de *P. denitrificans* a été faite dans des conditions plus dénaturantes que dans notre étude (solubilisation des membranes à un ratio protéine:détergent de 1:1, tampons de purification à 2 mM de β -DDM, soit 1,8 mM au-dessus de la cmc) ; les auteurs eux-mêmes pensent que leur échantillon est hétérogène. Dans le cas de l'étude sur *Bacillus sp. PS3*, les conditions utilisées sont aussi déstabilisantes : solubilisation effectuée en MEGA 9 à 75 mM (50 mM au-dessus de la cmc). Les résultats de gel filtration annoncent un super-complexe d'une masse moléculaire autour de 380 kDa (dans notre étude, le super-complexe est estimé à 570 kDa par gel filtration), ce qui est très faible en comparaison des masses moléculaires attendues, qui sont très proches pour *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus sp. PS3*. La probable dissociation du super-complexe de *Bacillus sp. PS3* limite les possibilités de comparaison. De plus, les expériences de photodissociation du monoxyde de carbone révèlent une hétérogénéité au niveau du site actif de la caa_3 , avec une population mixte d'hèmes de type a et o . Le pic à 604-605 nm étant un pic composite contenant les signaux de l'hème a bas spin et l'hème a_3 haut spin, la plus faible amplitude du pic chez *Geobacillus stearothermophilus* pourrait être expliquée par le plus faible taux de a_3 . L'hème o_3 possède des bandes étalées dans la région des hèmes b , son signal est masqué, et devient détectable lors de l'ajout de CO (cf. figure III.37).

La quantification des bandes sur gel, associée au fait que les rapports des concentrations hèmes $b:c$ sont souvent 2:3 (2 hèmes b et un c dans le b_6c , un c dans le cyt c_{550} et un dans l'oxydase), suggèrent un rapport b_6c :cyt c_{550} : caa_3 de 1:1:1.

Au cours de ce travail, de nombreux résultats montrent une hétérogénéité au sein de l'échantillon, probablement due à la coexistence de différents états oligomériques de l'assemblage supra-moléculaire durant la purification (cf. III.3.2), avec deux populations majoritaires, une d'une masse moléculaire d'environ 600 kDa et une d'une masse moléculaire supérieure à 800 kDa,

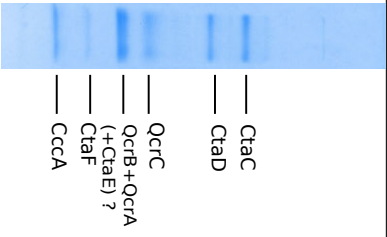
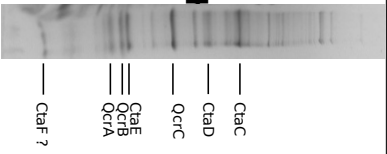
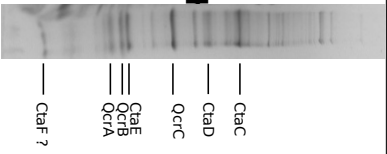
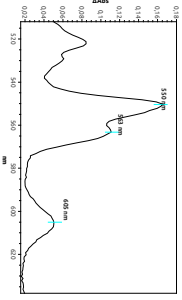
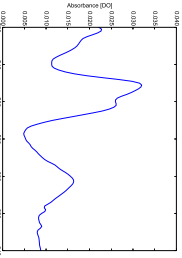
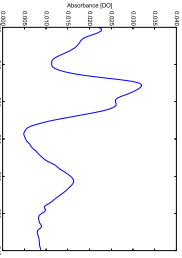
	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. sp PS3</i>	<i>P. denitrificans</i>
Complexes	<i>b6c:c550:caa3</i>	<i>bcc:aa3</i>	<i>b6c:c550:caa3</i>	<i>b6c:c550:caa3</i>	<i>bcc:aa3</i>
Hèmes bas spin attendus (<i>a : b : c</i>)	1 : 2 : 3	1 : 2 : 2	1 : 2 : 3	1 : 2 : 3	1 : 2 : 2
Gels SDS-PAGE					
Spectres visibles					
Références	III.4	(Niebisch et Bott, 2003)	D. Picot et E. Point	(Sone <i>et al.</i> , 1987)	(Berry et Trumpower, 1985)

TABLE IV.1 – **Comparaison des hèmes *a* au sein de différents super-complexes.** Les spectres sont des différences entre différents états redox sur des échantillons purifiés. *G. stearothermophilus* : Spectre "dithionite"- "oxydé". *C. glutamicum* : Spectres "dithionite"- "oxydé" d'échantillons purifié par une étiquette liée au *bcc* (QcrB) ou à l'oxydase (Ctad). *B. subtilis* : Spectre "dithionite"- "oxydé" à température ambiante (ligne continue) et à 80 K (ligne pointillée). de différence de l'échantillon purifié par immunoprécipitation : "dithionite"- "oxydé" à température ambiante (ligne continue) et à 80 K (ligne pointillée). *P. denitrificans* : bas : "dithionite"- "oxydé" ; milieu : "réduit à l'undécy-méaquinone"- "oxydé" ; haut : "réduit au dithionite"- "réduit à l'ascorbate". Cette dernière courbe traduit la présence de deux hèmes *b* avec des propriétés spectrales et des potentiels redox différents.

d'après les estimations à partir des expériences de tamis moléculaire.

Les complexes Rieske/*b* n'étant actifs que sous forme de dimère, on s'attend à avoir un dimère de cytochrome *b₆c* au sein du super-complexe. Dans le cas d'un assemblage stœchiométrique, on attend alors également deux complexes CcOx *caa₃* et deux cyt *c₅₅₀*. De plus, la masse moléculaire estimée à partir du volume d'élution sur tamis moléculaire de 570 kDa pourrait correspondre à la masse moléculaire d'un dimère de super-complexe, auquel la masse moléculaire du détergent serait ajoutée (cf. table IV.2). Notre hypothèse est donc que la "petite" population de super-complexe aurait une stœchiométrie (*b₆c*)₂ : (*c₅₅₀*)₂ : (*caa₃*)₂.

	<i>G. stearothermophilus</i>		
	Sous-unité	Cofacteurs	Masse moléculaire
Rieske / <i>b</i>	cyt <i>b₆</i> (QcrB)	2 <i>b</i> , <i>c_i</i>	25,4
	SU IV- <i>c</i> (QcrC)	<i>c</i>	27,9
	Rieske (QcrA) ;	[2Fe-2S]	19,3
cyt <i>c</i>	cyt <i>c₅₅₀</i>	<i>c</i>	13
CcOx	SUI (CtaC)	<i>a</i> , <i>a₃</i> , Cu _B	69
	SUII (CtaD)	<i>c</i> , Cu _A	40,1
	SUIII (CtaE)	-	23,3
	SUIV (CtaF)	-	12,3
MW_{théorique}	Monomère : 232 ; Dimère : 464		

TABLE IV.2 – Le super-complexe de *G. stearothermophilus*. Masses moléculaires en kDa.

La bactérie gram positive *Corynebacterium glutamicum* possède également un super-complexe entre le complexe Rieske/*b* et la CcOx, cytochrome *bcc*:CcOx *aa₃*. Le profil d'élution du super-complexe purifié de *G. stearothermophilus* est très proche de celui de *C. glutamicum*, avec une légère différence d'élution due à la différence de taille des complexes. Dans le cas du super-complexe de *C. glutamicum*, il est également difficile de déterminer une stœchiométrie et un état d'oligomérisation, cependant d'après Richers S (2008), ce super-complexe aurait une stœchiométrie cytochrome *bcc*:CcOx *aa₃* de 2:2, ce qui va dans le sens de notre hypothèse. De plus, les images de microscopie électronique du super-complexe purifié de *C. glutamicum* révèlent la présence de particules ovoïdes, d'une longueur entre 10 et 15 nm, ce qui correspond à la taille des petits objets détectés sur les images du super-complexe de *Geobacillus stearothermophilus* (cf. ronds rouges sur la figure III.21).

La population d'une masse moléculaire plus importante pourrait correspondre à un état supérieur d'organisation des complexes, peut être un dimère de dimère. Nous ne disposons pas aujourd'hui d'assez de données pour étayer ces hypothèses, qui devront être validées par la suite,

par exemple par des images de microscopie électronique, ou une meilleure compréhension des spectres visibles du super-complexe.

Stabilité de l'échantillon purifié

L'état et la stabilité des échantillons purifiés est une question récurrente en biochimie des protéines. Dans le cas de protéines composées d'un seul polypeptide, c'est surtout les phénomènes d'aggrégation, de dénaturation ou de protéolyse qui peuvent poser des problèmes. Avec des complexes protéiques constitués de plusieurs sous-unités s'ajoute le problème de la dissociation et de la perte de certaines sous-unités. Au niveau des super-complexes, les interactions supra-moléculaires semblent être encore plus faibles que les interactions intra-complexes, car lors de la dissociation du super-complexe, on peut retrouver les complexes isolés. Il faut alors travailler dans des conditions encore plus stabilisatrices. L'intérêt de notre objet d'étude est son origine thermophile, qui semble lui conférer une plus grande stabilité que le super-complexe issu de *B. subtilis*, organisme phylogénétiquement proche mais mésophile (croissance à 37°C).

La dissociation du super-complexe en cytochrome *b₆c* et CcOx *caa₃* a été observée à plusieurs reprises durant cette thèse, soit en raison d'une solubilisation à trop forte concentration de FC₁₄, soit suite à des tentatives d'échange de la FC₁₄ vers le β -DDM sur colonne, confirmant le rôle critique des détergents dans l'étude des super-complexes. Les détergents zwitterioniques, comme la FC₁₄ sont généralement plus dissociants, probablement à cause de leur capacité à se substituer aux lipides et à causer une délipidation de l'échantillon. L'influence de la FC₁₄ est observée notamment sur les expériences de migration sur gradient de saccharose et sur gels natifs (cf. figures III.8 et III.16). Il est possible d'ajouter des lipides pour atténuer le phénomène de délipidation, mais il est difficile de contrôler le ratio lipide:détergent au cours de la purification et lors de la cristallogénèse. Le protocole de purification en β -DDM permet l'isolement d'un super-complexe contenant le cytochrome *b₆c* et la CcOx *caa₃*, en plusieurs états oligomériques sensibles aux conditions de détergent utilisées. La population de super-complexe de plus haute masse moléculaire semblant assez instable, il est difficile de l'isoler de la plus petite population.

Le cytochrome *c₅₅₀* participe au super-complexe

Il est raisonnable de proposer que le cytochrome *c₅₅₀* participe au super-complexe chez *G. stearothermophilus*, et transporte les électrons de l'hème *c* de la sous-unité QcrC du cytochrome *b₆c* à l'hème *c* de la SU II de la CcOx *caa₃*. C'est également le cas chez *P. denitrificans*, avec la présence du cytochrome *c₅₅₂* au sein du super-complexe Rieske/*b* : CcOx (Stroh *et al.*, 2004). *C. glutamicum* au contraire ne possède pas de partenaire métabolique de type cytochrome *c* entre le complexe Rieske/*b* et l'oxydase, mais sa sous-unité QcrC est un dihème contenant deux hèmes de type *c*. Une des justifications de la formation d'un super-complexe au sein de la chaîne respiratoire de cette bactérie est l'absence de cytochrome *c* soluble, la formation d'un super-complexe serait donc indispensable au passage des électrons. *Geobacillus stearothermophilus* possède un

hème *c* sur la SU II de l'oxydase ainsi qu'un cyt *c*₅₅₀, et contient donc un groupe redox supplémentaire entre le centre Fer-Soufre de la Rieske et le site actif de l'oxydase par rapport à *C. glutamicum*. L'ajout d'un groupe redox peut servir à réduire la distance entre deux autres groupes redox et ainsi faciliter le passage des électrons, mais peut aussi constituer une étape intermédiaire, afin de stocker plus d'électrons au sein de la chaîne et de limiter la saturation. Une autre hypothèse est que la distance entre l'hème *c* de QcrC et celui de la SU II de l'oxydase est trop importante pour permettre le passage de l'électron à une vitesse acceptable. L'ajout du cyt *c*₅₅₀ pourrait permettre un meilleur transfert de l'électron entre les deux complexes. Il est aussi envisageable que cette protéine soit nécessaire à la formation de l'assemblage supra-moléculaire.

La résolution des structures des super-complexes de *G. stearothermophilus* et *C. glutamicum* permettront de mieux comprendre les transferts d'électrons au sein des super-complexes, notamment en permettant de positionner les différents groupes redox dans l'espace.

Isolement d'un super-complexe fonctionnel ?

L'activité du super-complexe n'a pas été déterminée durant cette étude, ce qui reste pourtant un paramètre important à tester lors de la purification d'une protéine. Cependant, mettre en place un test d'activité pour le super-complexe peut s'avérer difficile et long. En effet, le super-complexe fonctionne avec des ménaquinones, qui s'oxydent spontanément en présence d'oxygène, l'accepteur final d'électron de la CcOx. Pour pouvoir calculer une activité, l'enzyme doit être bien plus active que cette réaction parasite. *G. stearothermophilus* étant un organisme thermophile, l'activité optimale de ses enzymes requière une température élevée : toutes les mesures d'activité sont effectuées au minimum à 40°C pour la CcOx de *Bacillus sp. PS3* (Sone et Fujiwara, 1991a). A cette température, il est non seulement difficile de dissoudre de l'oxygène dans l'eau, mais la réaction d'oxydation des hydroquinones est aussi accélérée. De plus, nous ne disposons pas au laboratoire d'électrode à oxygène pouvant travailler dans ces gammes de température. La solution serait de tester séparément l'activité des deux complexes, grâce à l'ajout d'inhibiteurs. Durant cette thèse, le temps a manqué pour mettre au point un tel test d'activité, mais c'est une des perspectives du projet.

IV.3 Caractérisation de l'hème *c_i*

La comparaison des séquences en acides aminés des sous-unités cyt *b*₆ et SU IV-*c* de différents membres du clade vert (cf. figure I.21) révèle la conservation d'une cystéine en position 35 de la sous-unité *b*₆ du cytochrome *b*_{6f}, chez plusieurs espèces contenant un cytochrome *b*_{6f} ou un cytochrome *b*_{6c}. La présence de ce résidu, ligand de l'hème *c_i* chez le *b*_{6f}, suggère que cet hème haut spin atypique est également présent dans le site de réduction des quinones du cytochrome *b*_{6c}. Cette hypothèse a été confirmée par coloration TMBZ sur gel SDS-PAGE, puis par spectroscopie visible et RPE. La détermination de son potentiel redox, à la fois par

spectroscopie optique (-20 mV) et par spectroscopie RPE (-50 mV) révèle des valeurs proches du potentiel redox de la ménaquinone.

Un signal RPE simplifié

Autour de $g=6$, un signal d'hème haut spin peut-être attribué à l'hème c_i . Il est composé de deux g_x et d'un g_y . La présence de deux pics g_{x1} et g_{x2} peut être expliquée de deux façons :

1. il existe une seule population d'hèmes c_i avec un signal rhombique dédoublé. Ce dédoublement pourrait être dû à une interaction avec l'hème b_H dans son état oxydé, situé à proche distance de c_i . Ce couplage a été observé dans le cytochrome b_6f , mais notre hypothèse n'a pas pu être vérifiée expérimentalement dans le cytochrome b_6c par la même méthode au cours de cette étude.
2. il existe plusieurs populations d'hèmes c_i , de rhombicité différente, en raison par exemple de leur interaction avec différents ligands axiaux, ou avec un même ligand axial mais dans des conformations différentes.

A ce stade de notre étude il est difficile de discriminer entre ces deux hypothèses. La présence d'un signal d'hème c_i non dédoublé a été observé à bas pH (cf. figure III.33b), pouvant correspondre à l'apparition d'une seconde population plus "axiale" (dans le cas de l'hypothèse 1), ou à un troisième signal (dans le cas de l'hypothèse 2). Cependant ce changement de signal peut également être dû à la perte de l'interaction avec l'hème b_H .

Un ligand axial protéique ?

Les différences entre le signal de l'hème c_i du cytochrome b_6f et celui du cytochrome b_6c (cf. figures III.30 et III.31) pourraient s'expliquer par la possible présence d'un ligand axial protéique chez ce dernier (cf. figure I.21), alors que l'hème c_i du cytochrome b_6f en est dépourvu. La structure de ce complexe suggère la présence d'un ion hydroxyde pouvant se lier au fer de l'hème (Stroebel *et al.*, 2003). Cette hypothèse est renforcée par la ressemblance des spectres de cytochrome b_6c avec les spectres de cytochrome b_6f en présence de NQNO, qui devient ligand axial (non-protéique) de l'hème c_i . Nous avons tenté de perturber l'interaction possible entre le fer de l'hème et le ligand glutamate putatif, en variant le pH de l'échantillon ou en ajoutant un inhibiteur du site Q_i : le NQNO. Les faibles changements de spectre du cytochrome b_6c lors de l'ajout de NQNO peuvent être dus à une non fixation de l'inhibiteur au fer de l'hème, ou à la difficulté de remplacer le ligand naturel. On ne peut toujours pas conclure si le glutamate est un ligand de l'hème, mais la difficulté à remplacer le ligand naturel ou les faibles variations de signal lors de la variation du pH peuvent traduire une interaction forte de ce dernier avec le fer de l'hème.

Un mécanisme possible de réduction des quinones au site Q_i

Le mécanisme réactionnel du site Q_i des complexes Rieske/ b possédant un hème c_i n'est toujours pas élucidé, la présence d'un hème additionnel suggérant un mécanisme différent par

rapport aux autres membres de cette famille. De plus, si l'intermédiaire réactionnel semiquinone a déjà été observé dans le site Q_i du cytochrome bc_1 (Robertson *et al.*, 1984), il ne l'a jamais été chez le cytochrome b_6f . La réduction de la quinone en hydroquinone au niveau du site Q_i requière la présence de deux électrons et deux protons. Les deux électrons sont acheminés depuis le site Q_o par la voie "bas potentiel" passant par les hèmes b_L , b_H et c_i . Une des hypothèses de la présence d'un hème c_i est la possibilité d'une réduction rapide de la quinone en hydroquinone, soit séquentielle en passant par un intermédiaire SQ, soit concertée sans intermédiaire réactionnel. En effet, un électron pourrait être stocké sur l'hème c_i , s'ajoutant à l'électron arrivant par b_H . La réduction implique également la présence de deux protons, provenant du côté interne de la membrane. Si l'hème c_i du cytochrome b_6c possède un ligand axial glutamate, la protonation préalable de ce résidu peut être envisagée comme une étape du cycle catalytique, permettant une réduction rapide de la quinone en hydroquinone (Duchâteau *et al.*, 2008).

La fonction de l'hème c_i reste un mystère

Ce travail de thèse a permis d'obtenir une première caractérisation de cet hème atypique dans un contexte respiratoire, et valide le cytochrome b_6c comme un modèle d'étude intéressant. Ce complexe, naturellement sur-exprimé dans les membranes de *G. stearothermophilus* et *B. subtilis* présente des signaux RPE même à des faibles concentrations, ne demandant donc pas de quantité très importante de matériel pour son étude par RPE. L'environnement de l'hème c_i chez *Geobacillus stearothermophilus* est différent de celui de l'hème c_i de *C. reinhardtii*, comme il avait été suggéré par les alignements de séquences. Cependant, nos résultats n'ont pas permis d'avancer sur la compréhension de la fonction de l'hème c_i . Des études de mutants de *C. reinhardtii* couplées à des études de cinétiques *in vivo* sur les Héliobactéries sont en cours. Des expériences de biologie moléculaire sont possibles chez *B. subtilis*, et en cours de mise en place chez *G. stearothermophilus*, et pourront éventuellement permettre la construction de mutants du site Q_i pour avancer dans la compréhension de la fonction de cet hème.

IV.4 Les transferts d'électrons dans une chaîne respiratoire à ménaquinone

Le cytochrome b_6c du super-complexe de *G. stearothermophilus* est, à notre connaissance, le premier complexe Rieske/ b fonctionnant avec des ménaquinones pour lequel les valeurs de tous les potentiels redox, y compris l'hème c_i , sont disponibles. De plus, l'organisation en super-complexe permet d'obtenir les potentiels redox des partenaires d'une voie de transfert d'électrons de la ménaquinone à l'oxygène dans les mêmes conditions expérimentales, de la croissance bactérienne à la titration en passant par la purification. Il est peu probable que l'organisation en super-complexe des enzymes impacte le potentiel redox des cofacteurs, qui sont enfouis dans la protéine, à l'exception des cofacteurs qui pourraient se trouver aux interfaces comme les hèmes c , pour lesquels il est difficile d'attribuer une valeur précise de potentiel redox car ils sont très

proches les uns des autres.

IV.4.1 Un décalage des potentiels redox

La première observation qui résulte de cette étude est un décalage d'environ -150 mV des potentiels redox de ce complexe Rieske/*b* utilisant des ménaquinones (MK), par rapport à ceux qui utilisent des ubiquinones (UQ) ou des plastoquinones (PQ) (cf. table IV.3). Cette différence correspond à peu près à la différence entre les potentiels redox des MK et des UQ ou PQ. Cet écart est moins prononcé au niveau des potentiels de la cytochrome *c* oxydase, qui se rapprochent de ceux des quinones à hauts potentiels, tout en restant plus bas.

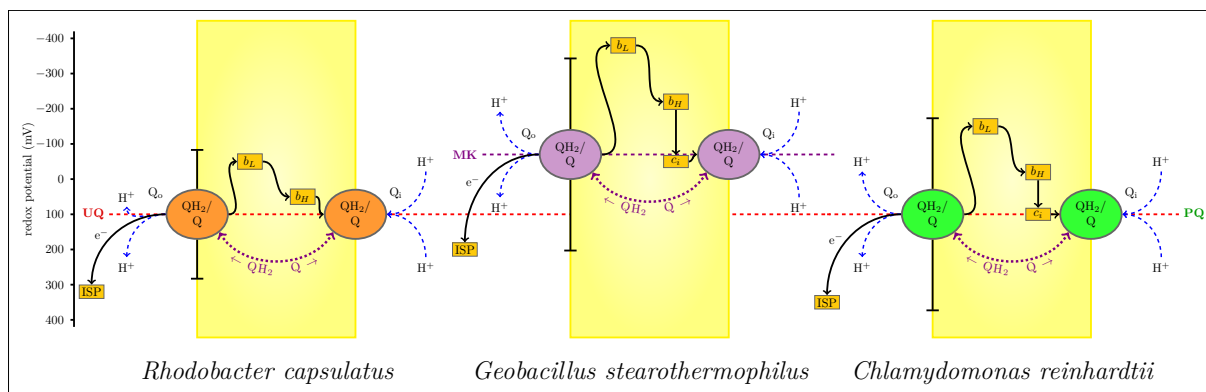


FIGURE IV.1 – **Comparaison des potentiels redox de plusieurs complexes Rieske/*b*.** Pour les données des potentiels redox, cf. table IV.3.

Le tableau IV.3 récapitule les résultats obtenus lors de nos titrations redox des cofacteurs du super-complexe, et les compare avec des données publiées pour d'autres complexes bioénergétiques. Le schéma IV.1 replace trois de ces résultats sur une échelle des potentiels, et permet d'observer un net décalage des potentiels redox entre les organismes utilisant des quinones haut potentiel comme *R. capsulatus* ou *C. reinhardtii* et les organismes à ménaquinone comme *C. glutamicum* ou *G. stearothermophilus*. Il semblerait donc que l'ensemble de la chaîne de transfert s'adapte au potentiel de la ménaquinone.

Les hèmes bas spin du super-complexe de *C. glutamicum* ont été titrés par électrochimie (Neehaul, 2012), révélant des potentiels en accord avec nos résultats pour les hèmes *b*. Pour les hèmes *a/a₃*, nos courbes de Nernst sont très proches de celles obtenues pour *C. glutamicum*, mais nous n'avons pas attribué les potentiels de la même façon. En effet, il semble qu'à 604 nm les deux vagues correspondraient au potentiel de l'hème *a* en interaction avec le site actif *a₃*:Cu_B (Petra Hellwig, communication personnelle).

Organisme	<i>G. stearothermophilus</i>	<i>C. glutamicum</i>	<i>C. reinhardtii</i>	<i>P. denitrificans</i>	<i>A. Aeolicus</i>	<i>Bacillus sp. PS3</i>	<i>H. mobilis</i>	<i>R. capsulatus</i>
Complexe	$b_6C:C_{550}:caa_3$	$bcc:aa_3$	b_6f	$bc_1:aa_3$	bc_1	b_6c	b_6cc	bc_1
Quinone	MK (-70 mV)	MK (-70 mV)	PQ (+100 mV)	UQ (+100 mV)	DMK* (-9 mV)	MK (-70 mV)	MK (-70 mV)	UQ (+100 mV)
b_L	-380 mV	-291 mV	-150 mV	-84 mV	-190 mV	-190 mV	-190 mV	-90 mV
b_H	-220 mV	-163 mV	-20 mV	-36 mV	-60 mV	-130 mV	-90 mV	+40 mV
c_i	-50 mV (RPE) -10 mV (vis)	-	+50 mV	-	-	na	na	-
c (mono-hème)	+160/+240 mV	-	+355 mV (cyt <i>f</i>)	+275 mV	+160 mV	+200 mV	-	+340 mV
c (di-hème)	-	+101 mV	-	-	-	-	+120 mV	-
Rieske	+200 mV	na	+340 mV	na	+210 mV	+165 mV	+150 mV	+310 mV
c	+160/+240 mV	-	-	-	-	+ 225 mV	-	-
c	+160/+240 mV	-	-	-	-	-	-	-
Cu _A	$\geq +200$ mV	na	-	na	-	-	-	-
a	+150/+340 mV	+143 mV	-	+430 mV	-	-	-	-
a_3	na	+317 mV	-	+178 mV	-	-	-	-
Réf.	III.4	(Neehaul, 2012)	(Alric <i>et al.</i> , 2005)	(El Khoury, 2010; Hellwig <i>et al.</i> , 1999)	(Schutz <i>et al.</i> , 2003)	(Kutoh et Sone, 1988; Fujiwara <i>et al.</i> , 1993; Liebl <i>et al.</i> , 1992)	(Kramer <i>et al.</i> , 1997; Liebl <i>et al.</i> , 1992)	(Baymann <i>et al.</i> , 1999; Howell et Robertson, 1993)

TABLE IV.3 – Comparaison de potentiels redox. * : Demethyl-ménaquinone. - : absence du cofacteur, na : no data.

IV.4.2 Le Q-cycle et les ménaquinones

Des résultats en accord avec la théorie du Q-cycle

Le mécanisme réactionnel des complexes Rieske/*b* a été décrit dans les années 1970 par Peter Mitchell sous l'appellation de Q-cycle, et est détaillé figure IV.2. Le fonctionnement de ce cycle nécessite une bifurcation des électrons de l'hydroquinone au niveau du site Q_o entre une voie bas potentiel et une voie haut potentiel. Cette bifurcation est rendue possible par la différenciation des potentiels redox des deux électrons de l'hydroquinone à des valeurs très différentes. Cette différenciation est contrôlée par l'environnement protéique, et répond aux contraintes thermodynamiques suivantes :

1. L'écart du potentiel redox des deux électrons au potentiel de la quinone est le même : $(E_{SQ/QH_2} + E_{SQ/Q})/2 = E_{Q/QH_2}$. Nous n'avons pas mesuré le potentiel redox des deux électrons de l'hydroquinone, mais les valeurs déterminées pour b_L et le centre [Fe-S] nous permettent d'obtenir une estimation de l'écart minimal entre les deux potentiels à un électron.
2. L'électron de la voie bas potentiel doit être transféré du site Q_o au site Q_i contre le potentiel transmembranaire $\Delta\psi$. Donc le potentiel SQ/Q doit être au moins inférieur au potentiel de la ménaquinone de $\Delta\psi$.

En reprenant l'argumentation du point (1), il s'ensuit que la différence de potentiel entre la Rieske et la ménaquinone doit également être d'environ $\Delta\psi$. On peut donc s'attendre à ce que la moyenne entre le potentiel de l'hème b_L et le groupe [Fe-S] de la Rieske soit proche de celui de la ménaquinone. C'est exactement ce que nous observons. Les potentiels redox déterminés pour les cofacteurs du cytochrome b_6c répondent parfaitement à la théorie du Q-cycle appliquée à un organisme à ménaquinone.

Un mécanisme de protection de la semiquinone ?

La semiquinone est l'intermédiaire réactionnel possible des réactions d'oxydo-réduction des quinones. La constante de stabilité de la semiquinone K_S est définie par les équations :

$$K_S = \frac{[SQ]^2}{[Q][QH_2]} \quad E_{m_{SQ/Q}} - E_{m_{QH_2/SQ}} = Z \log_{10} K_S$$

$$K_S = 10^{(E_{m_{SQ/Q}} - E_{m_{QH_2/SQ}})/Z} \quad (\text{Mitchell, 1976})$$

Avec $Z=RT/F \sim 60$ pour une réaction à un électron

Elle dépend du potentiel redox des couples SQ/Q et SQ/QH₂, donc du décalage des potentiels redox des deux électrons, qui est contrôlé par la protéine et n'est donc pas constant. Par exemple, au niveau du site Q_i du cytochrome bc_1 où la quinone reçoit ses deux électrons de l'hème b_H , il est plus avantageux pour l'intermédiaire semiquinone d'être stable, et le K_S est beaucoup plus proche de 1 (Osyczka *et al.*, 2005). La semiquinone est donc instable dans Q_o et stable dans Q_i dans le cas d'un site Q_i sans hème c_i . En présence de cet hème atypique le mécanisme

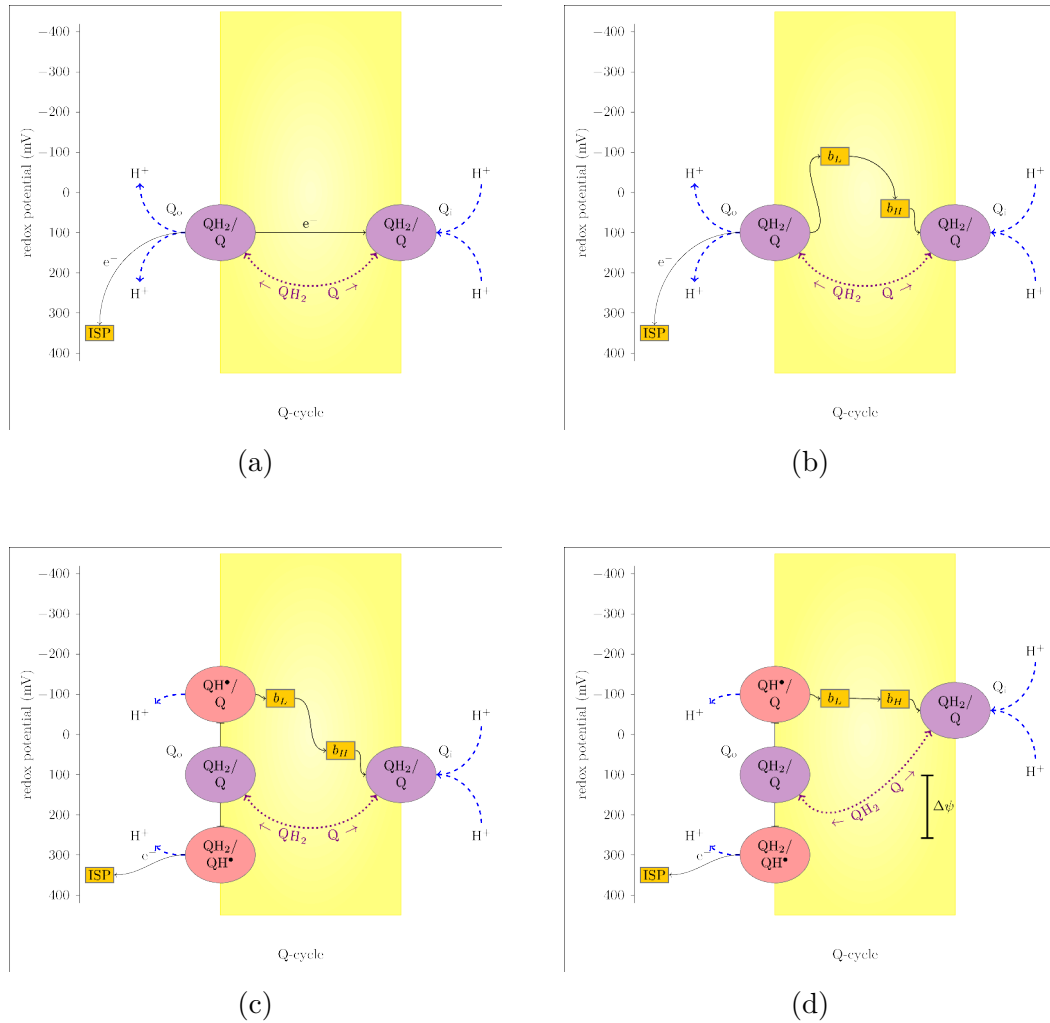


FIGURE IV.2 – **Le mécanisme du Q-cycle.** Le schéma décrit à la fois l'organisation spatiale, avec le plan de la membrane représenté en jaune, et les potentiels redox en abscisse. Le schéma est dessiné en utilisant les données de *R. capsulatus*. **(a)** Lors de l'oxydation de l'hydroquinone au site Q_o , deux électrons sont délivrés au complexe Rieske/ b , et sont bifurqués entre une voie haut potentiel vers le centre [Fe-S] de la protéine de Rieske (ISP), et une voie bas potentiel, vers le site Q_i pour réduire une autre quinone, **(b)** par l'intermédiaire des hèmes b_H et b_L . Cette bifurcation est rendue possible par la capacité qu'a la quinone de placer ses deux électrons à des potentiels redox très différents **(c)**. Cet écart doit être assez important pour assurer un transfert de l'électron au site Q_i , ce transfert doit être rapide afin d'éviter les court-circuits. Enfin, l'écart de potentiel doit être assez important pour compenser le potentiel membranaire, qui s'oppose au passage des électrons, et entraîne une baisse du potentiel redox apparent du site Q_i **(d)**.

réactionnel n'est pas élucidé et il est possible que la réaction se déroule sans intermédiaire semiquinone. Le point critique pour la formation de ROS n'est pas la ménaquinone réduite, mais l'intermédiaire semiquinone dans le site Q_o , qui est très réactive et qui possède un K_S très faible.

FIGURE IV.3 – Constante de stabilité de la semiquinone au site Q_o . La constante de stabilité dépend de l'amplitude la séparation des deux électrons de l'hydroquinone. Quand K_S (ou K_{stab} sur la figure) est faible, les potentiels des deux couples redox SQ/QH_2 et Q/SQ dépassent les potentiels du centre Fer-Soufre de la protéine de Rieske (en étant plus positif) et de l'hème b_L (plus négatif). Donc le transfert du premier électron de l'hydroquinone au centre Fe-S devient énergétiquement défavorable, et le passage du second électron devient favorable. Plus les deux électrons ont un potentiel redox éloigné, plus le transfert du premier électron entraînant l'apparition de la SQ sera lent. Par contre la seconde étape ($SQ \rightarrow Q$) sera très rapide. La constante de stabilité de la semiquinone traduit sa durée de vie. Tiré de Osyczka *et al.* (2005)

Image copyright

Nous ne connaissons pas les potentiels redox des deux couples SQ/Q et SQ/QH_2 , mais à partir des valeurs déterminées pour le centre Fe-S de la Rieske et l'hème b_L on peut obtenir une estimation haute du K_S . Cette estimation haute de $10^{-9,7}$ représente à notre connaissance le plus bas K_S déterminé à partir de b_L et de la Rieske pour une SQ , révélant un temps de vie très court pour cette dernière.

Au sein du site Q_o la semi-quinone peut réagir avec l'oxygène et produire des ROS, la déstabilisation importante créée par la grande amplitude existant entre les potentiels redox des deux électrons de l'hydroquinone a pour conséquence une réaction de transfert défavorable de l'électron à haut potentiel, mais une fois que cette réaction a eu lieu, le second électron va être transféré très rapidement à la chaîne bas potentiel vers le site Q_i , réduisant ainsi la possibilité de réactions entre la semiquinone et l'oxygène. Cette caractéristique du site Q_o pourrait être un des mécanismes de protection rendant possible le fonctionnement d'une chaîne respiratoire aérobie avec une quinone à bas potentiel.

IV.5 Perspectives

Une méthode de production et de purification d'un super-complexe stable et d'un haut niveau de pureté a été développée durant ces trois années, validant le super-complexe de *Geobacillus stearothermophilus* comme étant un bon modèle pour étudier les assemblages supra-moléculaires.

Notre objectif d'effectuer une étude structurale reste d'actualité. La détermination de la structure du super-complexe cytochrome $b_6c:cyt\ c_{550}:CcOx\ caa_3$ par cristallographie aux rayons X nécessite la purification de quantités importantes d'un super-complexe, pur, homogène et

stable. L’optimisation du protocole de purification doit être poursuivie afin d’atteindre cet objectif. L’échantillon possédant un degré de pureté et de stabilité acceptables, la question importante aujourd’hui est celle de l’homogénéité et de l’état oligomérique du super-complexe. Un travail conséquent reste à fournir dans cette direction. Le protocole de purification actuel entraîne la co-purification d’un super-complexe de différents états oligomériques : probablement un dimère $(b_6c)_2 : (c_{550})_2 : (caa_3)_2$ et un dimère de dimère $(b_6c)_4 : (c_{550})_4 : (caa_3)_4$. Il s’agit de définir lequel de ces super-complexes est le plus approprié pour une étude structurale, et tenter de stabiliser et d’isoler cette forme. L’utilisation de différents détergents ou l’ajout de lipides, couplés à des analyses par TLC, peuvent constituer des pistes intéressantes. Le super-complexe est un assemblage large de protéines membranaires, dont la biochimie n’est toujours pas bien comprise. Sa cristallisation est un travail de longue haleine, et à ce jour aucune structure à haute résolution n’est disponible. Une meilleure compréhension des signaux des hèmes ainsi qu’une étude précise de la composition en sous-unités pourront être utiles pour appréhender le super-complexe et son homogénéité.

Le super-complexe se révèle également être un bon modèle pour étudier les chaînes de transfert d’électrons. Les résultats de notre étude apportent une vision différente du fonctionnement des complexes Rieske/*b* à MK. Avec le super-complexe purifié, nous avons pu étudier la CTE en aval de la ménaquinone. De nombreuses questions demeurent quand à l’organisation et au fonctionnement de cette chaîne en amont de la ménaquinone, au niveau des déshydrogénases.

Ces études sont en phase avec le contexte scientifique, avec d’un côté, un intérêt retrouvé pour les assemblages supra-moléculaires et l’organisation physiologique des protéines au sein des membranes, et d’un autre côté, un renouveau des travaux sur les chaînes de transfert d’électrons en vue de leur utilisation comme antibiotiques. En effet, de récentes études des CTE de *Mycobacterium tuberculosis* (Lu *et al.*, 2014; Black *et al.*, 2014), *Staphylococcus aureus* (Schurig-Briccio *et al.*, 2014) entre autres bactéries sont en cours afin de développer de nouveaux moyens de lutter contre ces infections. Ce type de traitements visant la chaîne respiratoire existent déjà pour les chaînes à UQ, comme le cas de l’atovaquone pour traiter la malaria, et pourraient s’étendre à des complexes à MK. Aucune structure de complexes Rieske/*b* d’une chaîne à MK n’est disponible aujourd’hui, mais ces structures pourraient aider à développer de nouveaux inhibiteurs.

V Bibliographie

- ALRIC, J., PIERRE, Y., PICOT, D., LAVERGNE, J. et RAPPAPORT, F., Spectral and redox characterization of the heme c_i of the cytochrome b_6f complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102, 44, 15860–15865.
- ALTHOFF, Thorsten, MILLS, Deryck J, POPOT, Jean-Luc et KÜHLBRANDT, Werner, Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex $I_1III_2IV_1$. *The EMBO journal*, 2011, 30, 22, 4652–4664.
- ARUNMANEE, Wanatchaporn, HARRIS, J Robin et LAKEY, Jeremy H, Outer membrane protein F stabilised with minimal amphipol forms linear arrays and LPS-Dependent 2D crystals. *The Journal of membrane biology*, 2014.
- AZARKINA, N, SILETSKY, S, BORISOV, V, VON WACHENFELDT, C, HEDERSTEDT, L et KONSTANTINOV, A A, A cytochrome bb' -type quinol oxidase in *exitBacillus subtilis* strain 168. *The Journal of biological chemistry*, 1999, 274, 46, 32810–32817.
- BARADARAN, Rozbeh, BERRISFORD, John M, MINHAS, Gurdeep S et SAZANOV, Leonid A, Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*, 2013, 494, 7438, 443–448.
- BARUCQ-GABRIELLE, Lise, Etude structurale de mutants du site Qi et du site de chlorophylle du cytochrome b_6f : de nouveaux elements pour la relation structure-fonction du complexe.
- BAYMANN, F., MOSS, Da et MANTELE, W., An electrochemical assay for the characterization of redox proteins from biological electron-transfer chains. *Analytical Biochemistry*, 1991, 199, 2, 269–274.
- BAYMANN, F., ROBERTSON, D. E., DUTTON, P. L. et MANTELE, W., Electrochemical and spectroscopic investigations of the cytochrome bc_1 complex from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochemistry*, 1999, 38, 40, 13188–13199.
- BAYMANN, Frauke, GIUSTI, Fabrice, PICOT, Daniel et NITSCHKE, Wolfgang, The ci/bH moiety in the b_6f complex studied by EPR : a pair of strongly interacting hemes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104, 2, 519–524.
- BAZÁN, Soledad, MILEYKOVSKAYA, Eugenia, MALLAMPALLI, Venkata K. P. S., HEACOCK, Philip, SPARAGNA, Genevieve C. et DOWHAN, William, Cardiolipin-dependent reconstitution

-
- of respiratory supercomplexes from purified *saccharomyces cerevisiae* complexes III and IV. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288, 1, 401–411.
- BEAL, D., RAPPAPORT, F. et JOLIOT, P., A new high-sensitivity 10-ns time-resolution spectrophotometric technique adapted to in vivo analysis of the photosynthetic apparatus. *Review of Scientific Instruments*, 1999, 70, 1, 202–207.
- BERRY, E A et TRUMPOWER, B L, Isolation of ubiquinol oxidase from *paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome *bc*₁ and cytochrome *c* – *aa*₃ complexes. *The Journal of biological chemistry*, 1985, 260, 4, 2458–2467.
- BLACK, Philippa A., WARREN, Robin M., LOUW, Gail E., VAN HELDEN, Paul D., VICTOR, Thomas C. et KANA, Bavesh D., Energy metabolism and drug efflux in *mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58, 5, 2491–2503.
- BOTT, M. et NIEBISCH, A., The respiratory chain of *corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 2003, 104, 1-3, 129–153.
- BRANDT, U et TRUMPOWER, B, The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 1994, 29, 3, 165–197.
- BREYTON, C., TRIBET, C., OLIVE, J., DUBACQ, J. P. et POPOT, J. L., Dimer to monomer conversion of the cytochrome *b₆f* complex - causes and consequences. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 35, 21892–21900.
- CAO, Erhu, LIAO, Maofu, CHENG, Yifan et JULIUS, David, TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms. *Nature*, 2013, 504, 7478, 113–118.
- CECCHINI, Gary, Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu. Rev. Biochem.*, 2003, 72, 77–109.
- CHANCE, B, ERECINSKA, M et WAGNER, M, Mitochondrial responses to carbon monoxide toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1970, 174, 1, 193–204.
- COOPER, Chris E et BROWN, Guy C, The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide : chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2008, 40, 5, 533–539.
- CORNFORTH, Jw et JAMES, At, Structure of a naturally occurring antagonist of dihydrostreptomycin. *Biochemical Journal*, 1956, 63, 1, 124–130.
- CROFTS, Antony R, HONG, Sangjin, WILSON, Charles, BURTON, Rodney, VICTORIA, Doreen, HARRISON, Chris et SCHULTEN, Klaus, The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Qo-site of the cytochrome *bc*₁ complex. *Biochimica et biophysica acta*, 2013, 1827, 11-12, 1362–1377.

- CRUCIAT, C M, BRUNNER, S, BAUMANN, F, NEUPERT, W et STUART, R A, The cytochrome *bc*₁ and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 2000, 275, 24, 18093–18098.
- DAVIES, Karen M, STRAUSS, Mike, DAUM, Bertram, KIEF, Jan H, OSIEWACZ, Heinz D, RYCOVSKA, Adriana, ZICKERMANN, Volker et KÜHLBRANDT, Werner, Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108, 34, 14121–14126.
- DROP, Bartłomiej, WEBBER-BIRUNGI, Mariam, YADAV, Sathish K N, FILIPOWICZ-SZYMANSKA, Alicja, FUSETTI, Fabrizia, BOEKEMA, Egbert J et CROCE, Roberta, Light-harvesting complex II (LHCII) and its supramolecular organization in *chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et biophysica acta*, 2014, 1837, 1, 63–72.
- DUCLUZEAU, A L, CHENU, E, CAPOWIEZ, L et BAYMANN, F, The Rieske/cytochrome b complex of *Heliobacteria*. *Biochimica et biophysica acta*, 2008, 1777, 9, 1140–1146.
- DUCLUZEAU, Anne-Lise, SCHOEPP-COTHENET, Barbara, BAYMANN, Frauke, RUSSELL, Michael J et NITSCHKE, Wolfgang, Free energy conversion in the LUCA : quo vadis ? *Biochimica et biophysica acta*, 2013.
- DUCLUZEAU, Anne-Lise, SCHOEPP-COTHENET, Barbara, VAN LIS, Robert, BAYMANN, Frauke, RUSSELL, Michael J. et NITSCHKE, Wolfgang, The evolution of respiratory o₂/NO reductases : an out-of-the-phylogenetic-box perspective. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 2014, 11, 98.
- DUDKINA, Natalya V, KUDRYASHEV, Mikhail, STAHLBERG, Henning et BOEKEMA, Egbert J, Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108, 37, 15196–15200.
- DUVAL, Simon, SANTINI, Joanne M., NITSCHKE, Wolfgang, HILLE, Russ et SCHOEPP-COTHENET, Barbara, The small subunit AroB of arsenite oxidase LESSONS ON THE [2Fe-2S] RIESKE PROTEIN SUPERFAMILY. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 27, 20442–20451.
- EFREMOV, Rouslan G. et SAZANOV, Leonid A., Structure of the membrane domain of respiratory complex i. *Nature*, 2011, 476, 7361, 414–U62.
- EL KHOURY, Youssef, *Mid and far infrared spectroelectrochemical studies on the metalligand interactions in respiratory chain enzymes*. Strasbourg, 2010. URL <http://www.theses.fr/2010STRA6127>.
- FUJIWARA, Y., OKA, M., HAMAMOTO, T. et SONE, N., Cytochrome c-551 of the thermophilic bacterium PS3, DNA sequence and analysis of the mature cytochrome. *Biochim. Biophys. Acta*, 1993, 1144, 2, 213–219.

-
- GALKIN, Alexander et BRANDT, Ulrich, Superoxide radical formation by pure complex I (NADH :ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of biological chemistry*, 2005, 280, 34, 30129–30135.
- GARCÍA MONTES DE OCA, Led Yered Jafet, CHAGOLLA-LÓPEZ, Alicia, GONZÁLEZ DE LA VARA, Luis, CABELLOS-AVELAR, Tecilli, GÓMEZ-LOJERO, Carlos et GUTIÉRREZ CIRLOS, Emma Berta, The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 2012, 44, 4, 473–486.
- GIBSON, Qh et GREENWOOD, C., Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide. *Biochemical Journal*, 1963, 86, 3, 541–&.
- GOHON, Yann, DAHMANE, Tassadite, RUIGROK, Rob W H, SCHUCK, Peter, CHARVOLIN, Delphine, RAPPAPORT, Fabrice, TIMMINS, Peter, ENGELMAN, Donald M, TRIBET, Christophe, POPOT, Jean-Luc et EBEL, Christine, Bacteriorhodopsin/amphipol complexes : structural and functional properties. *Biophysical journal*, 2008, 94, 9, 3523–3537.
- HABERSETZER, Johan, ZIANI, Widade, LARRIEU, Isabelle, STINES-CHAUMEIL, Claire, GIRAUD, Marie-France, BRÈTHES, Daniel, DAUTANT, Alain et PAUMARD, Patrick, ATP synthase oligomerization : From the enzyme models to the mitochondrial morphology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45, 1, 99–105.
- HACKENBROCK, C R, GUPTE, S, WU, E S et JACOBSON, K, Lateral diffusion, collision and efficiency of oxidation-reduction components in mitochondrial electron transport. *Biochem. Soc. Trans.*, 1984, 12, 3, 402–403.
- HALDANE, J S, Claude Bernard’s conception of the internal environment. *Science (New York, N.Y.)*, 1929, 69, 1791, 453–454.
- HARBITZ, Espen et ANDERSSON, K. Kristoffer, Cytochrome c-554 from *methylosinus trichosporium* OB3b ; a protein that belongs to the cytochrome c2 family and exhibits a HALS-Type EPR signal. *PLoS ONE*, 2011, 6, 7, e22014.
- HELLWIG, Petra, GRZYBEK, Stefan, BEHR, Julia, LUDWIG, Bernd, MICHEL, Hartmut et MÄNTELE, Werner, Electrochemical and Ultraviolet/Visible/Infrared spectroscopic analysis of heme *a* and *a*₃ redox reactions in the cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* : Separation of heme *a* and *a*₃ contributions and assignment of vibrational modes. *Biochemistry*, 1999, 38, 6, 1685–1694.
- HOCHLI, M., HOCHLI, L. et HACKENBROCK, Cr, Independent lateral diffusion of cytochrome-*bc*₁ complex and cytochrome-oxidase in the mitochondrial inner membrane. *Eur. J. Cell Biol.*, 1985, 38, 1, 1–5.

- HOFLE, G., KUNZE, B., ZORZIN, C. et REICHENBACH, H., Antibiotics from gliding bacteria .23. stigmatellin-a and stigmatellin-b 2 novel antibiotics from stigmatella-aurantiaca (myxobacterales). *Liebigs Annalen Der Chemie*, 1984, , 12, 1883–1904.
- HOWELL, N. et ROBERTSON, De, Electrochemical and spectral-analysis of the long-range interactions between the Qo and Qi sites and the heme prosthetic groups in ubiquinol cytochrome-c oxidoreductase. *Biochemistry*, 1993, 32, 41, 11162–11172.
- HUNTE, Carola, ZICKERMANN, Volker et BRANDT, Ulrich, Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science (New York, N. Y.)*, 2010, 329, 5990, 448–451.
- HURT, E. et HAUSKA, G., Identification of the polypeptides in the cytochrome b6f complex from spinach chloroplasts with redox-center-carrying subunits. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 1982, 14, 5-6, 405–424.
- INGLEDEW, W. J. et POOLE, R. K., The respiratory chains of Escherichia coli. *Microbiological Reviews*, 1984, 48, 3, 222–271.
- IWAI, Masakazu, TAKIZAWA, Kenji, TOKUTSU, Ryutaro, OKAMURO, Akira, TAKAHASHI, Yui-chiro et MINAGAWA, Jun, Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature*, 2010, 464, 7292, 1210–1213.
- JAGENDOR A, Uribe E, ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1966, 55, 1, 170–&.
- KABASHIMA, Yoshiki, SONE, Nobuhito, KUSUMOTO, Tomoichirou et SAKAMOTO, Junshi, Purification and characterization of malate :quinone oxidoreductase from thermophilic bacillus sp. PS3. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2012, 45, 1-2, 131–136.
- KANA, B. D., WEINSTEIN, E. A., AVARBOCK, D., DAWES, S. S., RUBIN, H. et MIZRAHI, V., Characterization of the cydAB-encoded cytochrome bd oxidase from Mycobacterium smegmatis. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183, 24, 7076–7086.
- KELLEY, D. S., KARSON, J. A., BLACKMAN, D. K., FRUH-GREEN, G. L., BUTTERFIELD, D. A., LILLEY, M. D., OLSON, E. J., SCHRENK, M. O., ROE, K. K., LEBON, G. T. et RIVIZZIGNO, P., An off-axis hydrothermal vent field near the mid-atlantic ridge at 30 degrees N. *Nature*, 2001, 412, 6843, 145–149.
- KERSCHER, S J, Diversity and origin of alternative NADH :ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et biophysica acta*, 2000, 1459, 2-3, 274–283.
- KERSCHER, Stefan, DRÖSE, Stefan, ZICKERMANN, Volker et BRANDT, Ulrich, The three families of respiratory NADH dehydrogenases. *Results and problems in cell differentiation*, 2008, 45, 185–222.

-
- KIM, J. Dongun, SENN, Stefan, HAREL, Arye, JELEN, Benjamin I. et FALKOWSKI, Paul G., Discovering the electronic circuit diagram of life : structural relationships among transition metal binding sites in oxidoreductases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2013, 368, 1622, 20120257.
- KIRCHHOFF, Helmut, Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes. *Biochimica et biophysica acta*, 2014, 1837, 4, 495–502.
- KMITA, Katarzyna et ZICKERMANN, Volker, Accessory subunits of mitochondrial complex I. *Biochem. Soc. Trans.*, 2013, 41, 5, 1272–1279.
- KRAMER, D. M., SCHOEPP, B., LIEBL, U. et NITSCHKE, W., Cyclic electron transfer in *Helio-bacillus mobilis* involving a menaquinol-oxidizing cytochrome bc complex and an RCI-type reaction center. *Biochemistry*, 1997, 36, 14, 4203–4211.
- KURISU, Genji, ZHANG, Huamin, SMITH, Janet L et CRAMER, William A, Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis : tuning the cavity. *Science (New York, N.Y.)*, 2003, 302, 5647, 1009–1014.
- KUTOH, E et SONE, N, Quinol-cytochrome c oxidoreductase from the thermophilic bacterium PS3. purification and properties of a cytochrome $bc_1(b_6f)$ complex. *The Journal of biological chemistry*, 1988, 263, 18, 9020–9026.
- LANE, Nick, ALLEN, John F. et MARTIN, William, How did LUCA make a living ? chemiosmosis in the origin of life. *BioEssays*, 2010, 32, 4, 271–280.
- LAPUENTE-BRUN, Esther, MORENO-LOSHUERTOS, Raquel, ACIN-PEREZ, Rebeca, LATORRE-PELLICER, Ana, COLAS, Carmen, Balsa, Eduardo, PERALES-CLEMENTE, Ester, QUIROS, Pedro M., CALVO, Enrique, RODRIGUEZ-HERNANDEZ, M. A., NAVAS, Placido, CRUZ, Raquel, CARRACEDO, Angel, LOPEZ-OTIN, Carlos, PEREZ-MARTOS, Acisclo, FERNANDEZ-SILVA, Patricio, FERNANDEZ-VIZARRA, Erika et ANTONIO ENRIQUEZ, Jose, Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science*, 2013, 340, 6140, 1567–1570.
- LE BAS, Audrey, *Etude par mutagénèse dirigée de l'environnement de deux cofacteurs du cytochrome b_6f : l'hème ci et la chlorophylle.* Paris 7, 2013. URL <http://www.theses.fr/2013PA077125>.
- LE MAIRE, M, CHAMPEIL, P et MOLLER, J V, Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et biophysica acta*, 2000, 1508, 1-2, 86–111.
- LIAO, Maofu, CAO, Erhu, JULIUS, David et CHENG, Yifan, Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 2013, 504, 7478, 107–112.

- LIEBL, U, PEZENNEC, S, RIEDEL, A, KELLNER, E et NITSCHKE, W, The rieske FeS center from the gram-positive bacterium PS3 and its interaction with the menaquinone pool studied by EPR. *The Journal of biological chemistry*, 1992, 267, 20, 14068–14072.
- LIEBL, Ursula, SLED, Vladimir, BRASSEUR, Gaël, OHNISHI, Tomoko et DALDAL, Fevzi, Conserved nonliganding residues of the Rhodobacter capsulatus rieske iron-sulfur protein of the bc_1 complex are essential for protein structure, properties of the $[2Fe-2S]$ cluster, and communication with the quinone pool. *Biochemistry*, 1997, 36, 39, 11675–11684.
- LLORENTE-GARCIA, Isabel, LENN, Tchern, ERHARDT, Heiko, HARRIMAN, Oliver L, LIU, Lu-Ning, ROBSON, Alex, CHIU, Sheng-Wen, MATTHEWS, Sarah, WILLIS, Nicky J, BRAY, Christopher D, LEE, Sang-Hyuk, SHIN, Jae Yen, BUSTAMANTE, Carlos, LIPHARDT, Jan, FRIEDRICH, Thorsten, MULLINEAUX, Conrad W et LEAKE, Mark C, Single-molecule in vivo imaging of bacterial respiratory complexes indicates delocalized oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta*, 2014.
- LU, Yun, QIAO, Feng, YOU, Xue-Fu et YANG, Xin-Yi, [research progresses of mycobacterium tuberculosis cytochrome p450s as a potential drug target]. *Yao Xue Xue Bao = Acta Pharmaceutica Sinica*, 2014, 49, 4, 427–434.
- LYONS, Joseph A, ARAGÃO, David, SLATTERY, Orla, PISLIAKOV, Andrei V, SOULIMANE, Tewfik et CAFFREY, Martin, Structural insights into electron transfer in *caa3*-type cytochrome oxidase. *Nature*, 2012, 487, 7408, 514–518.
- MAGALON, Axel, ARIAS-CARTIN, Rodrigo et WALBURGER, Anne, Supramolecular organization in prokaryotic respiratory systems. *Adv. Microb. Physiol.*, 2012, 61, 217–266.
- MARREIROS, Bruno C., BATISTA, Ana P., DUARTE, Afonso M. S. et PEREIRA, Manuela M., A missing link between complex I and group 4 membrane-bound $[NiFe]$ hydrogenases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2013, 1827, 2, 198–209.
- MCMULLAN, G., CHRISTIE, J. M., RAHMAN, T. J., BANAT, I. M., TERNAN, N. G. et MARCHANT, R., Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus geobacillus. *Biochemical Society Transactions*, 2004, 32, 214–217.
- MILEYKOVSKAYA, Eugenia, PENCZEK, Pawel A, FANG, Jia, MALLAMPALLI, Venkata K P S, SPARAGNA, Genevieve C et DOWHAN, William, Arrangement of the respiratory chain complexes in *Saccharomyces cerevisiae* supercomplex III_2IV_2 revealed by single particle cryo-electron microscopy. *The Journal of biological chemistry*, 2012, 287, 27, 23095–23103.
- MITCHELL, P, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 1961, 191, 144–148.
- MITCHELL, P., Protonmotive Q-cycle - general formulation. *Febs Letters*, 1975, 59, 2, 137–139.

-
- MITCHELL, P., Possible molecular mechanisms of protonmotive function of cytochrome systems. *Journal of Theoretical Biology*, 1976, 62, 2, 327–367.
- MOSER, Christopher C., KESKE, Jonathan M., WARNCKE, Kurt, FARID, Ramy S. et DUTTON, P. Leslie, Nature of biological electron transfer. *Nature*, 1992, 355, 6363, 796–802.
- NAZINA, T. N., TOUROVA, T. P., POLTARAUS, A. B., NOVIKOVA, E. V., GRIGORYAN, A. A., IVANOVA, A. E., LYSENKO, A. M., PETRUNYAKA, V. V., OSIPOV, G. A., BELYAEV, S. S. et IVANOV, M. V., Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli : descriptions of geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov. and geobacillus uzenensis sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of bacillus stearothermophilus, bacillus thermocatenulatus, bacillus thermoleovorans, bacillus kaustophilus, bacillus thermodenitrificans to geobacillus as the new combinations g. stearothermophilus, g. th. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51, 2, 433–446.
- NEEHAUL, Yashvin, Study of protein in the respiratory chain by IR spectroscopy and electrochemistry.
- NEWBY, Zachary E. R., O'CONNELL, Joseph D., GRUSWITZ, Franz, HAYS, Franklin A., HARRIES, William E. C., HARWOOD, Ian M., HO, Joseph D., LEE, John K., SAVAGE, David F., MIERCKE, Larry J. W. et STROUD, Robert M., A general protocol for the crystallization of membrane proteins for x-ray structural investigation. *Nature Protocols*, 2009, 4, 5, 619–637.
- NIEBISCH, Axel et BOTT, Michael, Purification of a cytochrome *bc* – *aa*₃ supercomplex with quinol oxidase activity from Corynebacterium glutamicum. identification of a fourth subunity of cytochrome *aa*₃ oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome *c*₁. *The Journal of biological chemistry*, 2003, 278, 6, 4339–4346.
- NIKAIDO, K., SAKAMOTO, J., NOGUCHI, S. et SONE, N., Over-expression of *cbaAB* genes of bacillus stearothermophilus produces a two-subunit SoxB-type cytochrome *c* oxidase with proton pumping activity. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1456, 1, 35–44.
- NITSCHKE, W, VAN LIS, R, SCHOEPP-COTHENET, B et BAYMANN, F, The "green" phylogenetic clade of rieske/cytb complexes. *Photosynthesis research*, 2010, 104, 2-3, 347–355.
- OSYCZKA, Artur, MOSER, Christopher C. et DUTTON, P. Leslie, Fixing the Q cycle. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30, 4, 176–182.
- PAGE, Christopher C., MOSER, Christopher C., CHEN, Xiaoxi et DUTTON, P. Leslie, Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. *Nature*, 1999, 402, 6757, 47–52.
- PEREIRA, M M, SANTANA, M et TEIXEIRA, M, A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases. *Biochimica et biophysica acta*, 2001, 1505, 2-3, 185–208.

- PIERRE, Y., BREYTON, C., LEMOINE, Y., ROBERT, B., VERNOTTE, C. et POPOT, J. L., On the presence and role of a molecule of chlorophyll a in the cytochrome b_6f complex. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272, 35, 21901–21908.
- RAFFAELLO, Anna et RIZZUTO, Rosario, Mitochondrial longevity pathways. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2011, 1813, 1, 260–268.
- RAJENDRAN, Chitra, ERMLER, Ulrich, LUDWIG, Bernd et MICHEL, Hartmut, Structure at 1.5 Å resolution of cytochrome c-552 with its flexible linker segment, a membrane-anchored protein from *Paracoccus denitrificans*. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 2010, 66, Pt 7, 850–854.
- RICHERS S, *Purification and Characterisation of the Respiratory Supercomplex III/IV from Corynebacterium glutamicum and Phospholipid Analysis of Membrane Proteins*. Johann Wolfgang Goethe-Universität, 2008.
- ROBERTSON, De, PRINCE, Rc, BOWYER, Jr, MATSUURA, K., DUTTON, Pl et OHNISHI, T., Thermodynamic properties of the semiquinone and its binding-site in the ubiquinol-cytochrome-c (c2) oxidoreductase of respiratory and photosynthetic systems. *Journal of Biological Chemistry*, 1984, 259, 3, 1758–1763.
- RUTHERFORD, A. William, OSYCZKA, Artur et RAPPAPORT, Fabrice, Back-reactions, short-circuits, leaks and other energy wasteful reactions in biological electron transfer : Redox tuning to survive life in O₂. *FEBS Letters*, 2012, 586, 5, 603–616.
- SAZANOV, Leonid A., BARADARAN, Rozbeh, EFREMOV, Rouslan G., BERRISFORD, John M. et MINHAS, Gurdeep, A long road towards the structure of respiratory complex I, a giant molecular proton pump. *Biochemical Society Transactions*, 2013, 41, 5, 1265–1271.
- SCHURIG-BRICCIO, Lici A., YANO, Takahiro, RUBIN, Harvey et GENNIS, Robert B., Characterization of the type 2 NADH :menaquinone oxidoreductases from *staphylococcus aureus* and the bactericidal action of phenothiazines. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2014, 1837, 7, 954–963.
- SCHUTZ, M., SCHOEPP-COTHENET, B., LOJOU, E., WOODSTRA, M., LEXA, D., TRON, P., DOLLA, A., DURAND, M. C., STETTER, K. O. et BAYMANN, F., The naphthoquinol oxidizing cytochrome bc_1 complex of the hyperthermophilic knallgasbacterium *aquifex aeolicus* : Properties and phylogenetic relationships. *Biochemistry*, 2003, 42, 36, 10800–10808.
- SCHÄGGER, H et VON JAGOW, G, Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry*, 1991, 199, 2, 223–231.
- SCHÄGGER, Hermann et PFEIFFER, Kathy, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J*, 2000, 19, 8, 1777–1783.

-
- SCHÄGGER, Hermann et PFEIFFER, Kathy, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 2000, 19, 8, 1777–1783.
- SCHÜTZ, Michael, BRUGNA, Myriam, LEBRUN, Evelyne, BAYMANN, Frauke, HUBER, Robert, STETTER, Karl-Otto, HAUSKA, Günter, TOCI, René, LEMESLE-MEUNIER, Danielle, TRON, Pascale, SCHMIDT, Christian et NITSCHKE, Wolfgang, Early evolution of cytochrome bc complexes. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 300, 4, 663–675.
- SLATER, Ec, Mechanism of phosphorylation in the respiratory chain. *Nature*, 1953, 172, 4387, 975–978.
- SONE, N et FUJIWARA, Y, Effects of aeration during growth of *Bacillus stearothermophilus* on proton pumping activity and change of terminal oxidases. *Journal of biochemistry*, 1991, 110, 6, 1016–1021.
- SONE, N. et FUJIWARA, Y., Heme-o can replace heme-a in the active-site of cytochrome-c-oxidase from thermophilic bacterium PS3. *Febs Letters*, 1991, 288, 1-2, 154–158.
- SONE, N, KAGAWA, Y et ORII, Y, Carbon monoxide-binding cytochromes in the respiratory chain of the thermophilic bacterium PS3 grown with sufficient or limited aeration. *J. Biochem.*, 1983, 93, 5, 1329–1336.
- SONE, N, KUTOH, E et SATO, K, A cytochrome o-type oxidase of the thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited conditions. *Journal of biochemistry*, 1990, 107, 4, 597–602.
- SONE, N., SEKIMACHI, M. et KUTOH, E., Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 32, 15386–15391.
- SONE, N. et YANAGITA, Y., A cytochrome *aa*₃-type terminal oxidase of a thermophilic bacterium purification, properties and proton pumping. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1982, 682, 2, 216–226.
- SONE, Nobuhito, TSUKITA, Sakura et SAKAMOTO, Junsu, Direct correlation between proton translocation and growth yield : An analysis of the respiratory chain of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87, 4, 495–499.
- STROEBEL, David, CHOQUET, Yves, POPOT, Jean-Luc et PICOT, Daniel, An atypical haem in the cytochrome *b₆f* complex. *Nature*, 2003, 426, 6965, 413–418.
- STROH, Anke, ANDERKA, Oliver, PFEIFFER, Kathy, YAGI, Takao, FINEL, Moshe, LUDWIG, Bernd et SCHÄGGER, Hermann, Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *The Journal of biological chemistry*, 2004, 279, 6, 5000–5007.

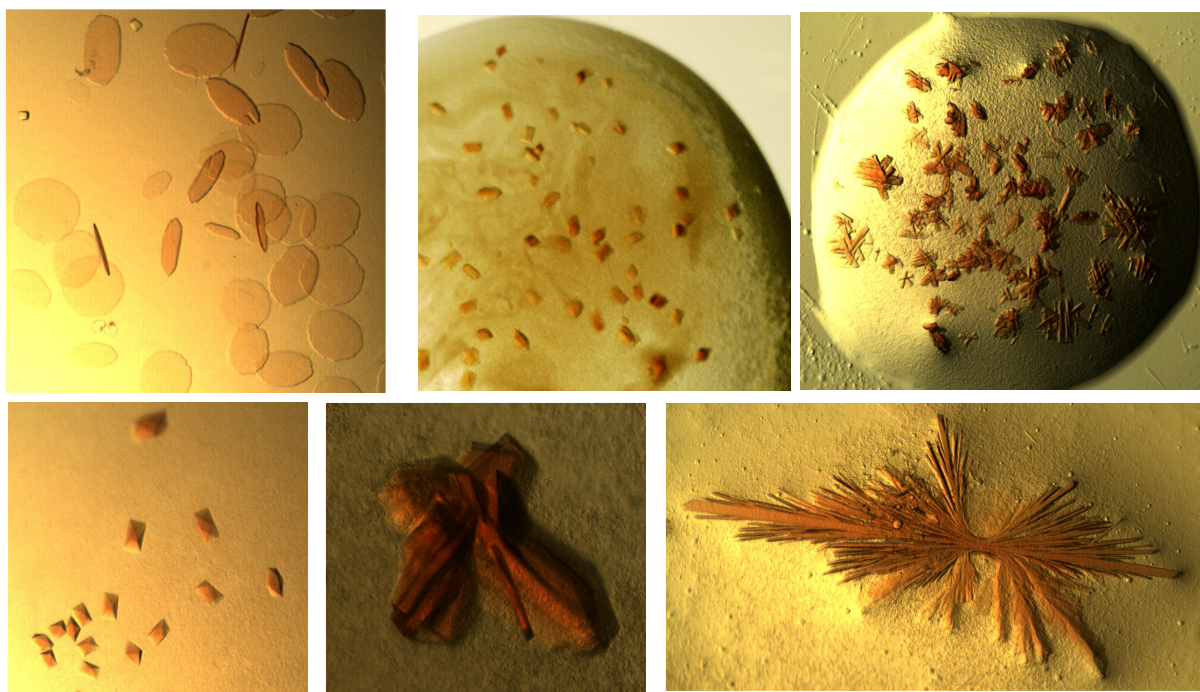
- THOMAS, P. E., RYAN, D. et LEVIN, W., An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome p-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 1976, 75, 1, 168–176.
- TOYOSHIMA, C, NAKASAKO, M, NOMURA, H et OGAWA, H, Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 a resolution. *Nature*, 2000, 405, 6787, 647–655.
- TROUILLARD, Martin, L'organisation de la chaine de transfert d'électrons respiratoire : développement d'une nouvelle methode pour l'étude spectrophotometrique en temps reel des transferts d'électrons respiratoires dans des cellules entieres.
- TROUILLARD, Martin, MEUNIER, Brigitte et RAPPAPORT, Fabrice, Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108, 45, E1027–1034.
- VON BALLMOOS, Christoph, WIEDENMANN, Alexander et DIMROTH, Peter, Essentials for ATP synthesis by F_1F_0 ATP synthases. *Annual review of biochemistry*, 2009, 78, 649–672.
- WACHENFELDT, C. von et HEDERSTEDT, L., Bacillus subtilis 13-kilodalton cytochrome c-550 encoded by cccA consists of a membrane-anchor and a heme domain. *Journal of Biological Chemistry*, 1990, 265, 23, 13939–13948.
- WELLS, Ic, Antibiotic substances produced by Pseudomonas aeruginosa - syntheses of pyo-ib, pyo-ic, and pyo-iii. *Journal of Biological Chemistry*, 1952, 196, 1, 331–340.
- WEVER, R. et VAN GELDER, B. F., Biochemical and biophysical studies on cytochrome c oxidase. XIX. an EPR study of the photodissociation of carboxycytochrome c oxidase in the presence of azide. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1974, 368, 3, 311–317.
- WILLIAMS, R J, Possible functions of chains of catalysts. *Journal of theoretical biology*, 1961, 1, 1–17.
- YAMASHITA, E, ZHANG, H et CRAMER, W A, Structure of the cytochrome b_6f complex : quinone analogue inhibitors as ligands of heme cn. *Journal of molecular biology*, 2007, 370, 1, 39–52.
- ZHANG, Haibo, OSYCZKA, Artur, DUTTON, P Leslie et MOSER, Christopher C, Exposing the complex III Qo semiquinone radical. *Biochimica et biophysica acta*, 2007, 1767, 7, 883–887.
- ZHANG, Huamin, PRIMAK, Andrew, CAPE, John, BOWMAN, Michael K., KRAMER, David M. et CRAMER, William A., Characterization of the high-spin heme x in the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis†. *Biochemistry*, 2004, 43, 51, 16329–16336.

Abréviations

ATP	Adénosine-triphosphate
BCA	BiCinchoninic acid
β -DDM	<i>n</i> -Dodécyl β -D-maltoside
Cmc	Concentration micellaire critique
CN-PAGE	Clear Native-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
CV	Volume de colonne
cyt	Cytochrome
CcOx	Cytochrome <i>c</i> oxydase
C ₁₂ E ₈	Dodécyl-octaoxyéthylène
CTE	Chaîne de transfert d'électrons
$\Delta\mu_{H^+}$	Gradient électro-chimique de protons
DTT	Dithiothréitol
HCO	Heme copper oxidase
FC ₁₄	Fos choline 14 (n-tétradécylphospholine)
K _S	Constante de stabilité de la semiquinone
MOPS	3-(N-morpholino)propane-sulfonique acide
MK	Ménaquinone
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NOR	Oxyde nitrique réductases
NQNO	2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxyde
O ₂ Rs	Oxygène Réductases (cytochrome/quinol oxydases)
PMSF	Fluorure de phénylméthylsulfonyl
pO ₂	Pression de dioxygène
PQ	Plastoquinone
RPE	Résonance Paramagnétique Électronique
ROS	"Reactive oxygen species" ou dérivés réactifs de l'oxygène
Sdh	Succinate déshydrogénase
SDS-PAGE	Sodium DodécylSulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SQ	Semiquinone
TDS	Tridécylstigmatelline
TMBZ	3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine
Tris	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
UQ	Ubiquinone

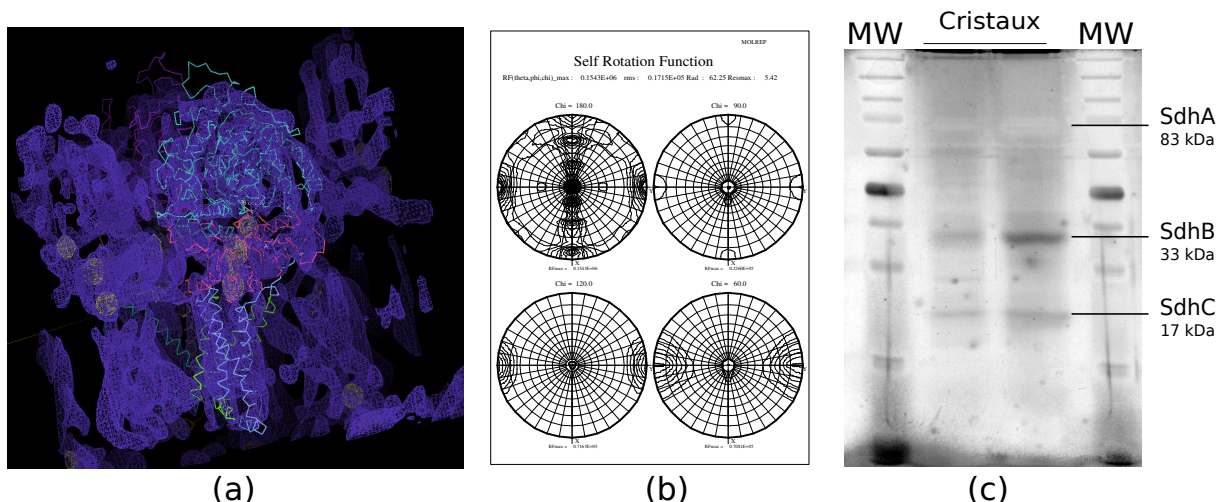
A Annexes

A.1 Obtention de cristaux



Quelques cristaux obtenus pendant nos test. La plupart ont été identifiés comme étant du complexe Sdh.

Les expériences de cristallogénèse ont abouti à l'obtention de cristaux, contenant, pour ceux testés, de la Succinate déshydrogénase (Sdh). Ce complexe est composé de trois sous-unités : SdhA (65 kDa), SdhB (28 kDa) et SdhC (23 kDa). Les cristaux sont obtenus à partir d'échantillons de super-complexe partiellement purifié et mélangé à la Sdh. Les spectres de ces échantillons contiennent une majorité d'hèmes de type *b*, et la migration sur gel d'un cristal dissous révèle la présence des sous-unités SdhA, B et C (cf. figure ??). Les cristaux ont diffracté à une résolution de 7 Å, le signal anomal des atomes de fer contenus dans les hèmes de l'échantillon a été utilisé pour déterminer la phase et obtenir une carte de densité électronique. Un remplacement moléculaire avec la structure 3SFE de la PDB (complexe II mitochondrial) permet d'identifier de façon certaine la Sdh.



Analyse des cristaux. (a) : ajustement de la structure 3SFE dans la carte de densité électronique obtenu après diffraction des cristaux (P. Legrand, Soleil). (b) : Fonction de Patterson (P. Legrand, Soleil). (c) : gel SDS de deux cristaux dissous. La bande de la SdhA se colore "négativement" en argent.

Tests de cristallogénèse du super-complexe

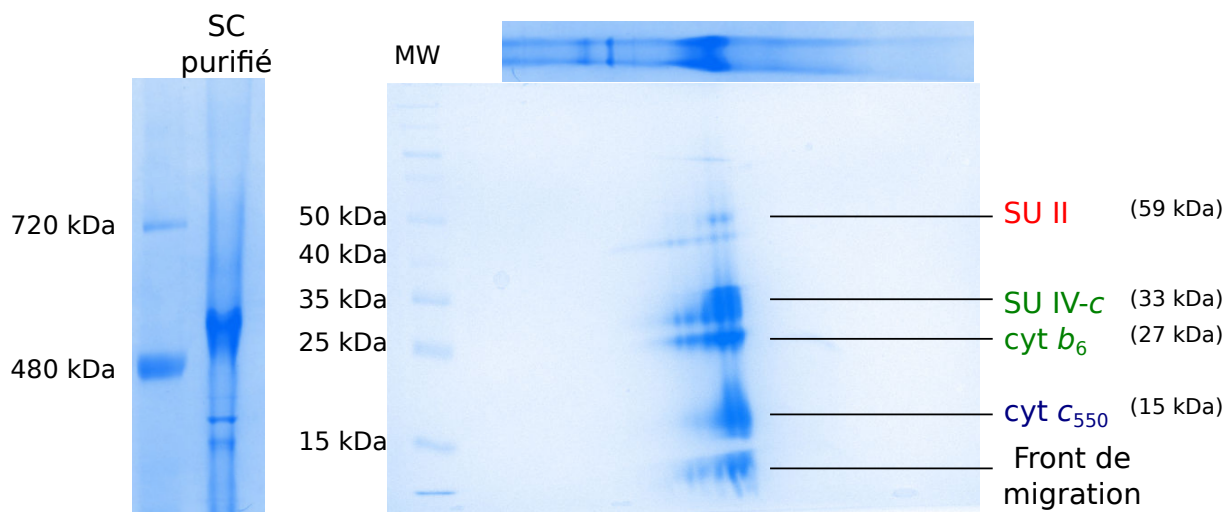
Des échantillons de super-complexe issus de différents protocoles de purification ont été utilisés pour faire des gouttes de cristallisation, à la fois à la main et en utilisant le robot mosquito de la plate-forme de cristallographie de l'institut Pasteur. Ces expériences ont menées à l'obtention de précipités, de séparations de phases ou encore de gouttes claires, mais pas de cristaux, probablement en raison de l'hétérogénéité de l'échantillon.

A.2 Gels natifs et gels 2D

Les gels natifs et les gels 2D sont des techniques largement utilisées pour l'étude des super-complexes. C'est d'ailleurs par cette technique que la question des super-complexes, quelque peu délaissée avant les années 2000, a été "remise au goût du jour" Schägger et Pfeiffer (2000b).

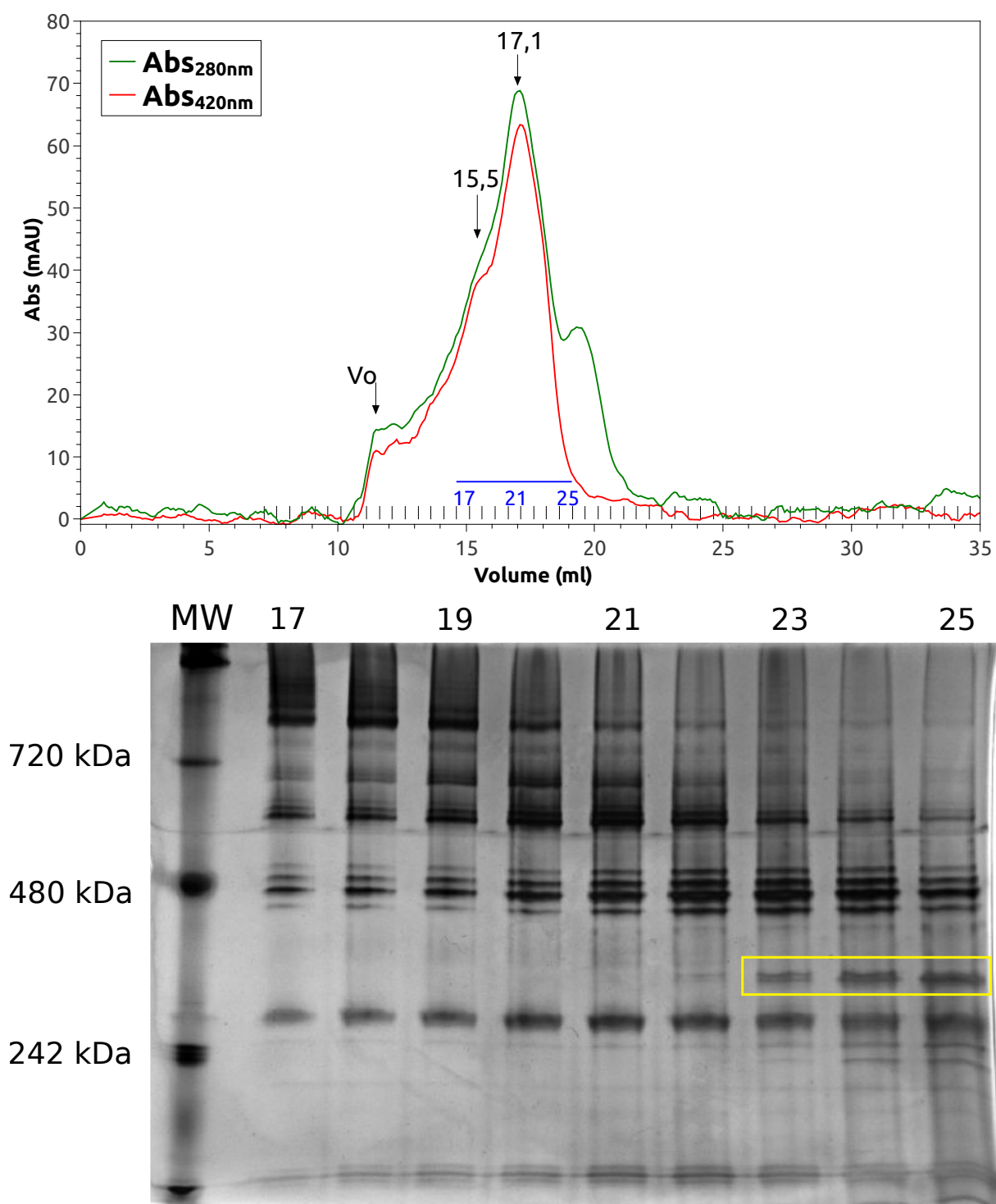
Au cours de cette étude, nous avons très peu utilisé les gels natifs. Tout d'abord nous nous sommes dans un premier temps focalisés sur l'obtention d'un super-complexe cytochrome $b_6c:CcOx$ *caa3*, et que la question de l'état oligomérique est apparue assez tardivement dans ce travail. Ensuite cette technique n'est pas forcément très fiable, la migration en elle-même pouvant causer des dénaturations ou des agrégations, faussant ainsi les résultats. Enfin, nous avons eu du mal à interpréter nos gels natifs, donc ces gels ainsi que les gels 2D ne nous ont pas été très utiles et ont été peu utilisés. La figure ?? présente un des gels 2D réalisés durant cette thèse.

Protocole : Pour faire un gel 2D, on réalise d'abord un gel natif (cf. II.2.1), puis une seconde dimension en conditions dénaturantes. La bande de gel natif à étudier est délicatement découpée,



Gel natif et gel 2D d'un échantillon de super-complexe purifié. **Gauche :** Gel natif d'un échantillon purifié en FC₁₄. Une seule population de super-complexe migre au niveau du marqueur à 450 kDa, ce qui suggère que la purification a sûrement entraîné une certaine dissociation. **Droite :** migration de cette bande en conditions dénaturantes suivie d'une coloration au TMBZ. Les bande migrent à des poids moléculaires apparents plus élevés que dans les migrations "classiques" en SDS-PAGE.

puis placée pendant 20 min sous agitation dans une solution contenant 125 mM de Tris HCl pH 7,4; 4% SDS; 20% glycérol; 50 mM DTT, préalablement chauffée au bain-marie à 37 °C. Cette bande, dont les protéines sont à présent dénaturées est placée sur un gel SDS-PAGE, dont le stacking est assez fin pour laisser la place à la bande. La bande est glissée entre la plaque de verre et la plaque de silice, puis peut être fixée au gel en ajoutant un peu de solution de stacking et en laissant polymériser, mais cela n'est pas forcément utile. La migration se fait alors de la même façon que pour un gel SDS classique, et les bandes peuvent être révélées par coloration au TMBZ ou au bleu de coomassie. La migration dans la seconde dimension est généralement moins résolutive que pour un gel SDS classique.



Gel natif des fractions d'élutions de la colonne de gel filtration Tsk G4000sw. Haut : Profil d'élution sur colonne Tsk G4000 sw. Bas : Gel natif CN-PAGE coloré à l'argent. Le carré jaune représente un contaminant qui n'est pas du super-complexe.

Résumé

Les membranes impliquées dans les processus bioénergétiques arborent une très grande densité de protéines, paramètre déterminant pour leur organisation supra-moléculaire. Dans ce travail, nous avons utilisé la bactérie thermophile *Geobacillus stearothermophilus* comme modèle pour étudier la formation de super-complexes de protéines membranaires, en vue d'une étude structurale. Nous avons purifié et caractérisé un super-complexe comprenant une menaquinol : cytochrome *c* oxydoréductase (*b₆c*), un cytochrome *c*₅₅₀ et une cytochrome *c* oxydase *caa₃*. En combinant des titrations par spectroscopie optique et résonance paramagnétique électronique, nous avons pu déterminer les potentiels d'oxydo-réduction de la plupart des cofacteurs et combler ainsi une lacune dans l'étude des chaînes de transfert d'électrons utilisant des quinones à bas potentiel redox, les ménaquinones. Nous avons ainsi montré que les potentiels redox des cofacteurs du cytochrome *b₆c* sont déterminés par celui des quinones. Ce travail va à l'encontre de données partielles antérieures publiées, mais est en parfait accord avec les modèles du Q-cycle de Peter Mitchell. Les résultats obtenus ont des répercussions sur les rendements bioénergétiques des différents maillons de la chaîne de transfert.

Mots clés : respiration, transferts d'électrons, super-complexes, titration redox.

Abstract

Bioenergetic membranes present a high protein density - a crucial factor for their organization into super-complexes. This project uses the thermophilic bacteria *Geobacillus stearothermophilus* as a model to study the formation of membrane protein super-complexes with the aim of structural studies. We purified and characterized a super-complex between a menaquinone : cytochrome *c* oxidoreductase (*b₆c*), a cytochrome *c*₅₅₀, and a cytochrome *c* oxidase *caa₃*. Using both optical and EPR spectroscopy methods, we performed the redox titrations of most of the redox cofactors of the super-complex. Thus, these results enable a new understanding of menaquinone-using electron transport chains, showing that quinones' redox potential determines the redox potential of the cytochrome *b₆c*'s cofactors. The conclusions differ from previous partial data, although they fit perfectly with Peter Mitchell's model of the Q-cycle. These unexpected redox potentials impact bioenergetic yields at different levels of the electron transfer chain.

Key words : respiration, electron transfer, super-complexes, redox titration.